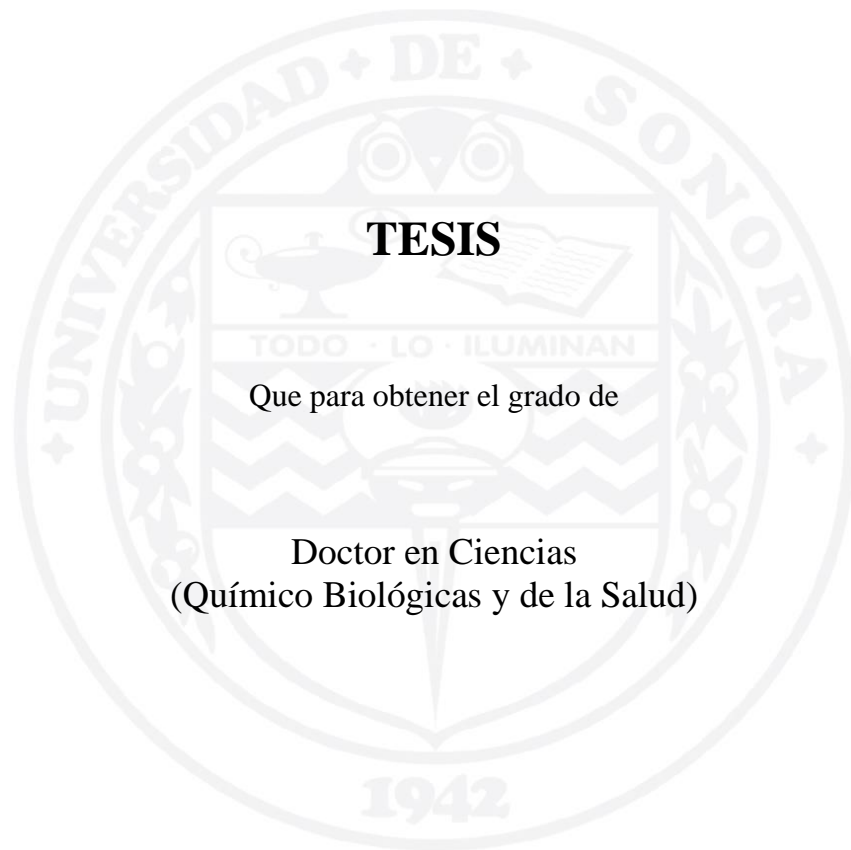


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Caracterización inmunológica de la proteína PE_PGRS33 de *Mycobacterium tuberculosis*



TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias
(Químico Biológicas y de la Salud)

Presenta

David Ortega Tirado

Hermosillo, Sonora

Enero de 2022

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis profesional de **David Ortega Tirado**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Doctor en Ciencias (Químico Biológicas y de la Salud)**.



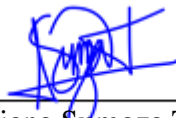
Dra. Adriana Garibay Escobar
Directora de Tesis



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Secretario



Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Sinodal



Dra. Adriana Sumoza Toledo
Sinodal



Dr. Jesús Efraín Alday Noriega
Sinodal

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Biología Celular del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora, bajo la dirección de la Dra. Adriana Garibay Escobar con financiamiento del CONACYT (proyecto No. 83224).

DEDICATORIAS

A mi tío Florencio, quien en vida siempre me brindó todo su amor y apoyo y, que aún después de la muerte, me sigue acompañando en cada paso de mi camino.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, a mis padres y hermanos cuyo apoyo siempre me acompaña en cada paso del camino. En especial a mi muy amada sobrina, quien nunca deja de darme ánimos. Asimismo, a mi tía Silvia quien aún desde lejos no deja de cuidarme y procurar mi bienestar

A la Dra. Adriana Garibay y al Dr. Carlos Velazquez por haberse convertido en mis mentores y contribuir en mi formación a través de todas sus enseñanzas, ejemplos y consejos. Asimismo, agradezco a los miembros del comité sinodal por todos los consejos y apoyo.

A la maestra Lucila Rascón por siempre estar al pendiente de todos nosotros y estar dispuesta a brindarnos su apoyo en todo momento.

A Jorge Iván, más que un amigo un hermano, por estar ahí en todo momento y poder contar con su incondicional apoyo.

A mis compañeros del laboratorio, por su ayuda y por todos esos momentos y anécdotas llenos de risas, los cuales convirtieron este viaje en una muy grata experiencia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
OBJETIVOS	xi
Objetivo General	xi
Objetivos Particulares	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Aspectos Generales de la Tuberculosis	4
Respuesta Inmune en TB	5
Macrófagos	8
Neutrófilos	8
Células dendríticas	9
Respuesta Inmune Adaptativa	10
Células T CD4 ⁺	10
Células T CD8 ⁺	12
Células B	13
Granuloma tuberculoso	14
Proteína PE_PGRS33 de <i>Mtb</i>	16
La Vacuna BCG y su Eficacia	19
Respuesta Inmune a la Vacuna BCG	20
Inmunoinformática en la Predicción de Péptidos de Células T	23
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Identificación de Péptidos Inmunodominantes de la Proteína PE_PGRS33 Mediante Inmunoinformática	29

Predicción de Péptidos de células T Restringidos a Moléculas de MHC-II	29
Construcción de Modelados de Homología de los Péptidos Inmunodominantes de la Proteína PE_PGRS33	29
Predicción de Alergenicidad y Reactividad Cruzada de PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes con Proteína Humanas	30
Predicción del Perfil de Unión a HLA y Cálculo del Porcentaje de Cobertura Poblacional de los Péptidos Inmunodominantes de PE_PGRS33	30
Evaluación de la Respuesta Inmune Hacia la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes	30
Aspectos Éticos	30
Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)	31
Aislamiento de Monocitos de PBMC	31
Estimulación de Monocitos Humanos con la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes	31
Establecimiento de un Modelo Humano de Infección <i>in vitro</i> con <i>Mycobacterium bovis</i> BCG (<i>M. bovis</i> BCG)	32
Análisis Estadístico	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Identificación de Péptidos Inmunodominantes de Células T de la Proteína PE_PGRS33	33
Interacciones Moleculares de los Péptidos Inmunodominantes de PE_PGRS33 con la Molécula I-A ^k	36
Homología de la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes con el Proteoma Humano	41
Potencial Alergénico de la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes	42

Perfil de Unión a Alelos HLA de Clase II y Análisis de Cobertura Poblacional de los Péptidos Inmunodominantes de la Proteína PE_PGRS33	44
Establecimiento de un Modelo Humano de Infección <i>in vitro</i>	45
Evaluación de la Activación de Monocitos Humanos Inducida por la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes	57
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. El espectro clínico de la TB	6
2. Transmisión de la TB pulmonar	7
3. Respuesta inmune celular contra <i>Mtb</i>	11
4. Patología y dinámica de la formación del granuloma en tuberculosis	15
5. Características estructurales y propiedades inmunogénicas de la proteína PE_PGRS33	17
6. Respuesta inmune hacia BCG después de la vacunación de un neonato	22
7. Modelos de homología de péptidos de células T	37
8. Comparación de interacciones entre péptidos y los bolsillos de la molécula I-A ^k	38
9. Modelo humano de infección <i>in vitro</i> con <i>M. bovis</i> BCG	49
10. La infección con <i>M. bovis</i> BCG induce muerte celular	50
11. <i>M. bovis</i> BCG escapa al medio extracelular durante un ensayo de infección <i>in vitro</i>	52
12. IFN- γ induce la producción de TNF- α en monocitos humanos.	54
13. Esquema de condiciones para el ensayo de infección <i>in vitro</i> con <i>M. bovis</i> BCG	55
14. Evaluación de la producción de IFN- γ en un sistema humano de infección <i>in vitro</i>	56
15. Secuencia de aminoácidos de los péptidos inmunodominantes de la proteína PE_PGRS33	59
16. La proteína PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes inducen la producción de TNF- α en monocitos humanos	60
17. Inmunidad innata entrenada	62

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Programas de predicción para identificar péptidos de células T con unión al MHC	25
II.	Identificación de péptidos inmunogénicos de células T de antígenos de <i>Mtb</i>	27
III.	Péptidos inmunodominantes de células T de PE_PGRS33	34
IV.	Interacciones moleculares del péptido DVINAPALA ₁₀₃₋₁₁₁ con I-A ^k	40
V.	Homología de los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33 con el proteoma humano	43
VI.	Perfil de unión a HLA de clase II de los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33	46
VII.	Cobertura poblacional de los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33	47

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar la respuesta inmune hacia la proteína PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes.

Objetivos Particulares

- Identificar los péptidos inmunodominantes de la proteína PE_PGRS33 mediante inmunoinformática.
- Desarrollar y caracterizar un modelo humano de infección *in vitro* con *Mycobacterium bovis* BCG.
- Evaluar la respuesta inmune hacia la proteína PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes, en un modelo humano de infección *in vitro* con *Mycobacterium bovis* BCG.

RESUMEN

La BCG es la única vacuna autorizada para su uso contra la tuberculosis (TB). Sin embargo, su protección contra la TB en adultos es muy variable, provocando también un control inadecuado de la transmisión de la enfermedad. En consecuencia, es necesario el desarrollo de una vacuna más eficiente. La proteína PE_PGRS33 de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) posee propiedades inmunogénicas que la hacen un buen candidato para el estudio de nuevos antígenos vacunales. Por lo tanto, se planteó el objetivo de caracterizar la respuesta inmune hacia la proteína PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes. Primero se identificaron los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33 mediante inmunoinformática. Posteriormente, se desarrolló un sistema humano de infección *in vitro* con *Mycobacterium bovis* BCG con el propósito de evaluar la respuesta inmune (RI) hacia la proteína PE_PGRS33 y sus péptidos. Para el sistema se utilizaron células mononucleares de sangre periférica aisladas de sujetos aparentemente sanos, BCG vacunados. La activación del sistema se evaluó a través del análisis de la secreción de IFN- γ . Además, se analizó la activación inducida por PE_PGRS33 y sus péptidos sobre monocitos humanos.

Se identificaron cinco péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33, de los cuales tres se sintetizaron de forma comercial para el análisis de la RI. Ninguno de los péptidos mostró homología considerable con el proteoma humano ni potencial alergénico. En el sistema humano de infección *in vitro* se lograron determinar las condiciones en las que se induce actividad, reportada mediante la detección de IFN- γ . PE_PGRS33 indujo la producción de TNF- α en los monocitos de todos los sujetos de estudio, mientras que sus péptidos inmunodominantes activaron sólo los monocitos de sujetos previamente sensibilizados hacia antígenos de *Mtb*.

Estos resultados nos permitirán conocer de forma más cercana la RI hacia antígenos micobacterianos, con la finalidad de contribuir al desarrollo de una vacuna más eficiente contra *Mtb*.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una infección bacteriana provocada en humanos principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), siendo el pulmón el sitio primario de infección (Pai et al., 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que un tercio de la población mundial está infectada con *Mtb*. En el año 2020, se reportó una incidencia de 9.9 millones de nuevos casos y 1.3 millones de muertes a nivel mundial a causa de esta enfermedad (World Health Organization, 2021).

Entre los orígenes de la problemática de la TB se encuentran la aparición de cepas drogo-resistentes, la asociación de casos VIH-SIDA/TB y la falta de una vacuna eficiente para controlar la enfermedad, siendo esta última una de las causas más relevantes (García et al., 2009). En la actualidad, la BCG es la única vacuna autorizada contra la TB (Soundarya et al., 2019). Esta vacuna ofrece protección en la infancia contra formas diseminadas de la enfermedad. Sin embargo, su protección contra la TB pulmonar en adolescentes y adultos es altamente variable (Principi & Esposito, 2015).

La eficacia de la vacuna se encuentra condicionada por diversos factores como el estado inmune del individuo, previa sensibilización a micobacterias y el área geográfica donde es administrada (Principi & Esposito, 2015), siendo la exposición previa a micobacterias no tuberculosas uno de los factores más influyentes (Abubakar et al., 2013). Por ende, nace la necesidad de desarrollar una vacuna más eficaz para controlar la enfermedad. Para tal cometido, es necesario el estudio de antígenos de *Mtb* capaces de desarrollar una respuesta inmune de tipo protectora, en la cual las células T CD4+ juegan un papel determinante (Garra et al., 2013).

Hoy en día, la búsqueda de nuevos antígenos protectores aplica los principios de la vacunología reversa. Estos consisten en predecir, con el uso de la secuencia genómica completa del patógeno, todos los antígenos que es capaz de expresar. Enseguida, uno o más antígenos pueden ser seleccionados y con ayuda de algoritmos de predicción es

posible detectar los péptidos con mayor probabilidad de ser reconocidos por el sistema inmune (Rajkumar Soni & Archana Tiwari, 2013). Finalmente, estos péptidos pueden ser obtenidos de manera recombinante con el objeto de evaluar su inmunogenicidad *in vivo* o *in vitro*. Todo lo anterior se realiza sin la necesidad de cultivar al patógeno *in vitro* (Rajkumar Soni & Archana Tiwari, 2013).

Para el caso de *Mtb*, es factible la aplicación de tales herramientas debido a que ya se conoce la secuencia completa de su genoma, donde el 5% codifica para la familia de proteínas PE_PGRS (Cole et al., 1998). Esta familia consta de 65 miembros y se caracterizan por poseer un dominio PE (prolina, ácido glutámico) de 110 aminoácidos en el extremo N-terminal, altamente conservado entre todos los miembros de la familia, y un dominio PGRS (secuencia polimórfica rica en glicina, por sus siglas en inglés) muy polimórfico en el extremo C-terminal (Cadieux et al., 2011). La proteína PE_PGRS33 es hasta el momento la más estudiada de todas.

La proteína PE_PGRS33 es codificada por el gen Rv1818c y consta de 499 aminoácidos (Vallecillo & Espitia, 2009). Su dominio PE se encuentra anclado a la pared celular micobacteriana y el dominio PGRS se ubica en el medio extracelular (Zumbo et al., 2013). Esta proteína se encuentra solamente en la superficie de micobacterias patógenas (Tian & Jian-ping, 2010).

Con el esfuerzo de diversos grupos de investigación se han podido conocer algunas de las propiedades inmunogénicas de esta proteína. Por ejemplo, Delogu y Brennan en 2001, obtuvieron las primeras evidencias acerca de la capacidad de PE_PGRS33 de inducir una respuesta inmune en un modelo murino. Además, se tiene conocimiento que tal respuesta inmune es de tipo celular para el dominio PE y de tipo humoral para el dominio PGRS (Cohen et al., 2014; Delogu & Brennan, 2001).

Adicionalmente, la proteína PE_PGRS33 y algunos de sus péptidos son capaces de inducir la secreción de IFN- γ en células T CD4⁺ de individuos con TB latente (Ortega-Tirado, Niño-Padilla, et al., 2020). Esta proteína también es capaz de estimular la producción de IL-2 y TNF- α en hibridomas de células T (Ortega-Tirado, 2016). Además,

se tiene conocimiento que la respuesta inmune hacia esta proteína podría ayudar a controlar el crecimiento de *Mtb in vivo* (Delogu et al., 2017).

Una vez seleccionado el antígeno, se requiere el uso de modelos de estudio para evaluar y analizar la respuesta inmune. En este sentido, el modelo murino ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la respuesta inmune hacia antígenos de *Mtb*; no obstante, la respuesta inmune generada por el ratón difiere de aquella en humanos. En consecuencia, se necesita el desarrollo de modelos de estudio humanos que permitan reproducir de manera más precisa el escenario de la infección por *Mtb*. Actualmente, una de las propuestas es el desarrollo de modelos humanos *in vitro* para el estudio de la TB en la población humana.

Lo anteriormente expuesto resalta la importancia de la creación de una vacuna más eficiente como una medida efectiva para un mejor control de la enfermedad. Para cumplirlo es esencial el estudio de antígenos de *Mtb* con potencial de inducir respuestas inmunes protectoras, aplicando modelos de estudio que reflejen con precisión el desarrollo de la TB en humanos. Atendiendo tal cometido, el objetivo de la presente investigación consiste en caracterizar la respuesta inmune hacia la proteína PE_PGRS33 de *Mtb* y sus péptidos inmunodominantes en un modelo humano de infección *in vitro*.

ANTECEDENTES

Aspectos Generales de la Tuberculosis

La TB es una infección bacteriana provocada en humanos principalmente por *Mtb*, siendo el pulmón el sitio primario de infección (Pai et al., 2016). La mayoría de los casos de TB son causados por *Mtb (sensu stricto)* o *Mycobacterium africanum*; siendo una minoría de los casos atribuidos a miembros zoonóticos del complejo *Mtb*, tal como *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium caprae* (Bos et al., 2014). Hasta el momento, el humano es el único reservorio conocido de *Mtb* (Comas et al., 2013).

La OMS reporta que un tercio de la población mundial está infectada con *Mtb*. En el año 2020 se reportó una incidencia de 9.9 millones de nuevos casos; dos tercios de estos casos se presentaron en ocho países: India (26%), Indonesia (8.4%), China (8.4%), Filipinas (6%), Pakistán (5.8%), Nigeria (4.6%), Bangladesh (3.6%) y Sudáfrica (3.3%) (World Health Organization, 2021).

La TB es la segunda causa de muerte a nivel mundial debida a un agente infeccioso. En 2020, 1.3 millones de personas murieron de TB, de estos, 214 000 individuos estaban infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (World Health Organization, 2021). Está reportado que un cuarto de la población mundial presenta la forma latente de la enfermedad, del cual entre el 5 y 15% desarrollarán, en un período de meses a pocos años, la forma activa de la TB (Tiemersma et al., 2011).

En ausencia de tratamiento, alrededor del 50% de los individuos que desarrollan la forma activa de la enfermedad morirán a causa de esta (Vynnycky & Fine, 1997). El tratamiento estándar para la TB comprende cuatro antibióticos: rifampicina, isoniazida, etambutol y pirazinamida. Estos cuatro fármacos se administran de forma simultánea por dos meses, seguido de la administración de rifampicina e isoniazida por cuatro meses adicionales (Furin et al., 2019). No obstante, se puede presentar resistencia a cualquiera de estos fármacos. La TB multidrogo-resistente, definida como resistencia al menos a rifampicina e isoniazida, ha sido reportada en todos los países (Pai et al., 2016). Casos de

TB extensivamente drogo-resistente, definida como aquella resistente no sólo a rifampicina e isoniazida sino también a cualquier fluoroquinolona y cualquier de los tres aminoglucósidos inyectables de segunda línea, provoca manifestaciones más serias de la enfermedad (Pai et al., 2016). En 2020, se reportaron aproximadamente 132 222 casos de TB resistente a rifampicina y 25 681 casos de TB extensivamente drogo-resistente (World Health Organization, 2021).

La TB afecta principalmente el pulmón, presentándose enfermedad pulmonar en más del 80% de los casos (Ankrah et al., 2018). Sin embargo, la TB puede afectar cualquier zona del cuerpo, esparciéndose hacia otros órganos mediante la vía linfática o hematogena, ocasionando distintas variantes de TB extrapulmonar (Ankrah et al., 2018). Los síntomas de esta enfermedad dependerán del órgano afectado. Cuando un individuo desarrolla TB pulmonar presenta síntomas como fiebre, fatiga, sudoraciones nocturnas, tos (por más de tres semanas), pérdida de peso, dolor torácico o abdominal y hemoptisis (Suárez et al., 2019). En sujetos inmunocompetentes la enfermedad avanza lentamente, pero en aquellos inmunocomprometidos o en niños se puede presentar TB fulminante (Suárez et al., 2019).

La TB se transmite de individuo a individuo por la vía aérea. Una vez en el pulmón, *Mtb* puede ser eliminado por el sistema inmune, ser contenido en un estado inducido de dormancia o dar paso a la forma activa de la enfermedad (Cooper, 2009). El resultado dependerá del estado inmune del individuo y los factores de virulencia de *Mtb*, dando lugar a distintos estadios de la enfermedad que van desde la eliminación de la infección hasta una TB latente, TB subclínica y TB activa (Pai et al., 2016) (Figura 1).

Respuesta Inmune en TB

El *Mycobacterium tuberculosis* se transmite por vía aérea, cuando un individuo sano respira pequeñas gotas en forma de aerosol que contienen el bacilo (Figura 2). Estas gotas provienen de secreciones liberadas al momento de hablar, toser o estornudar, por un individuo con la forma activa de la enfermedad. Una vez inhaladas, estas gotas que contienen micobacteria atraviesan el tracto respiratorio superior hasta llegar al pulmón.

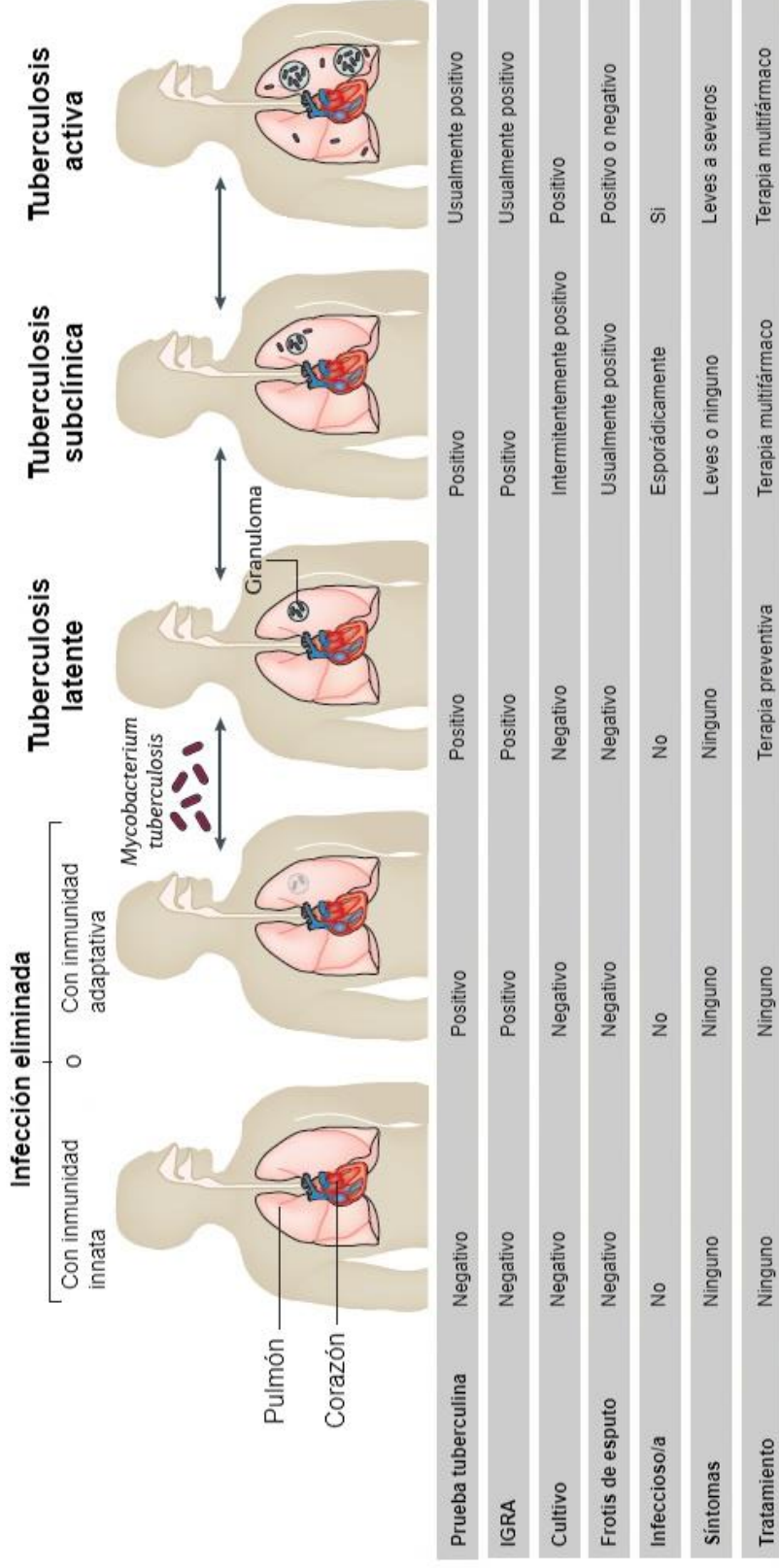


Figura 1. El espectro clínico de la TB. Dependiendo del estado inmune del individuo infectado por *Mtb*, este puede eliminar la infección o presentar estadios de la enfermedad como tuberculosis latente, subclínica o la enfermedad activa. IGRA, ensayo de liberación de IFN- γ . Modificado de Pai y colaboradores (Pai et al., 2016).

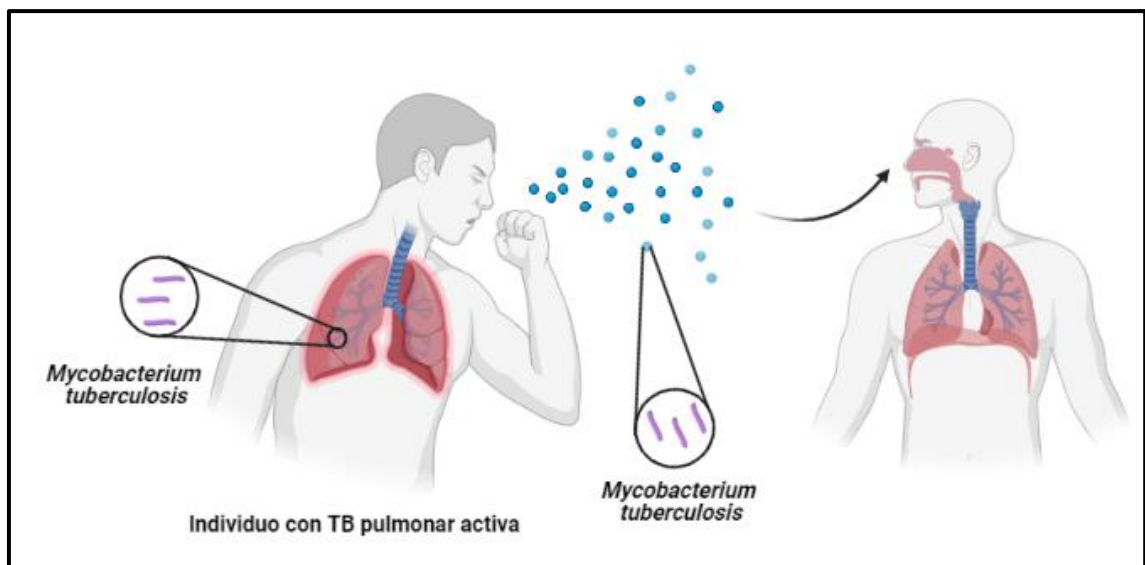


Figura 2. Transmisión de la TB pulmonar. La TB se transmite cuando un individuo con TB pulmonar activa al estornudar, toser o hablar, expulsa pequeñas gotas de aerosol que contienen a *Mycobacterium tuberculosis*. Este aerosol es respirado por un individuo sano, promoviendo así la transmisión de la infección. TB, tuberculosis. Imagen creada con Biorender.com.

La infección inicia en el alveolo pulmonar, donde *Mtb* establece interacción con las células del sistema inmune innato, principalmente macrófagos alveolares, neutrófilos y células dendríticas.

Macrófagos

Los macrófagos representan la primera línea de defensa contra *Mtb*, así como su principal nicho replicativo (de Martino et al., 2019; Sia & Rengarajan, 2019). El reconocimiento de *Mtb* por los macrófagos guía a la fagocitosis de la micobacteria y su internalización en fagosomas, cuya función es destruir patógenos mediante la fusión con los lisosomas (Sia & Rengarajan, 2019). Sin embargo, *Mtb* posee estrategias de evasión de la respuesta inmune que le permiten eludir los distintos mecanismos bactericidas del macrófago. Entre estas estrategias se encuentran la inhibición del tráfico celular, inducción de muerte celular, así como la neutralización de componentes tóxicos; como las especies reactivas del oxígeno y metales, el cobre y el zinc (Lerner et al., 2015). Estos últimos son tóxicos para la micobacteria, razón por la cual este patógeno ha desarrollado medidas de protección como la captura y oxidación de estos metales (Neyrolles et al., 2015). En respuesta, los macrófagos intentan bloquear la llegada de nutrientes a *Mtb*, tal como el hierro y manganeso (Neyrolles et al., 2015). Asimismo, *Mtb* es capaz de romper la membrana del fagosoma y ganar acceso al citosol, esto mediante la actividad formadora de poros de ESAT-6 (antígeno de secreción temprana de 6 kD, por sus siglas en inglés).

Neutrófilos

Los neutrófilos son las células presentes con mayor abundancia en muestras de lavado bronquio alveolar y esputo de pacientes con TB activa (Kroon et al., 2018). Estas células desempeñan funciones que contribuyen a la protección contra *Mtb*. Por ejemplo, neutrófilos apoptóticos son fagocitados por macrófagos, lo que permite que los gránulos de los neutrófilos se fusionen con los fagosomas que contienen a *Mtb* dentro del macrófago, logrando ejercer una actividad efectiva contra la micobacteria (Tan et al., 2006).

No obstante, los neutrófilos también pueden ejercer un efecto negativo en la respuesta inmune contra *Mtb*, al causar daño en el tejido mediante la liberación de sus productos antimicrobianos (Kroon et al., 2018). Además, los neutrófilos expresan en su superficie el ligando de muerte programada (PD-L1) que interactúa con el receptor de muerte programada (PD-1) de los linfocitos (de Martino et al., 2019). Se ha encontrado un alto número de neutrófilos que expresan PD-L1 en pacientes con TB activa, lo que determina, durante el curso de la infección, la pérdida de la función e inducción de muerte celular en los linfocitos (Zhang et al., 2010).

Células Dendríticas

Las células dendríticas (DCs) cumplen una función de enlace entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Estas células son de gran importancia para el sistema inmune debido a su habilidad de presentar antígeno y a su gran capacidad de secretar citocinas y modular la activación de los linfocitos T.

Mtb es capaz de infectar DCs a través de la interacción con el receptor CD209, también conocido DC-SIGN. En condiciones normales, CD209 se une al receptor ICAM1 sobre las células endoteliales para favorecer la migración de las DCs. Durante la infección por *Mtb*, CD209 interactúa con el lipoarabinomano manosilado presente en la micobacteria, con lo cual se favorece el ingreso del patógeno hacia el interior de las DCs (Mihret, 2012). Este evento guía a un aumento en la producción de IL-10 y una disminución en la producción de IL-12 por parte de las DCs, lo cual promueve un ambiente inmunosupresor para los linfocitos T (Balboa et al., 2010; Wu et al., 2011). La manipulación de la maduración de las DCs podría representar una de las estrategias utilizadas por *Mtb* para establecer la infección en el pulmón ya que, al manipular este proceso, influye por consecuencia en el proceso de activación de células T antígeno-específicas. Además, es conocido el hecho de que *Mtb* es capaz de retardar la migración de las DCs hacia los órganos linfoides secundarios, promoviendo un retraso en el inicio de la respuesta inmune adaptativa contra la micobacteria (Robinson et al., 2015).

Respuesta Inmune Adaptativa

En la mayoría de los casos, el adecuado control de la infección por *Mtb* requiere del establecimiento de inmunidad protectora a cargo de la respuesta inmune adaptativa. Esto se ejemplifica por la incrementada susceptibilidad a la infección micobacteriana presentada en individuos infectados con VIH, quienes presentan un bajo número de linfocitos T CD4⁺, así como por estudios de susceptibilidad en ratones que carecen de la expresión de moléculas MHC II. La respuesta inmune adaptativa comienza cuando *Mtb* alcanza los órganos linfoides secundarios, donde DCs presentan distintos antígenos micobacterianos a los linfocitos T. Estas poblaciones de células T antígeno-específicas se encargan de orquestar una respuesta inmune de tipo celular contra *Mtb*, a la cual hasta el momento se le atribuye el mayor papel en el control de la infección (Figura 3). Esta respuesta se encuentra a cargo principalmente de las células T CD4⁺. No obstante, estudios han revelado también la importancia de las células CD8⁺, así como de la respuesta inmune humoral a cargo de las células B en el control de la infección.

Células T CD4⁺

Las células T CD4⁺ juegan un papel vital en el control de la infección. En humanos, esto queda evidenciado en pacientes con VIH, quienes presentan conteos disminuidos de estas células y una incrementada susceptibilidad a infecciones por micobacterias. Además, pacientes con TB pulmonar también presentan un conteo disminuido de T CD4⁺ en sangre periférica, atribuido a la migración de las mismas al sitio de infección (Hernandez et al., 2010). La principal participación de estas células en la inmunidad protectora contra *Mtb* se atribuye a su secreción de IFN- γ , ya que si bien, las células CD8⁺ también contribuyen a la secreción de esta citocina, la mayor proporción proviene de las CD4⁺ (Cooper, 2009).

El IFN- γ participa en la activación de macrófagos infectados con el objetivo de promover la destrucción de la micobacteria. Esta citocina activa mecanismos bactericidas en el macrófago como la producción de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno, así como un aumento en la expresión de moléculas del MHC II con lo cual se favorece la presentación de antígenos micobacterianos a las células CD4⁺.

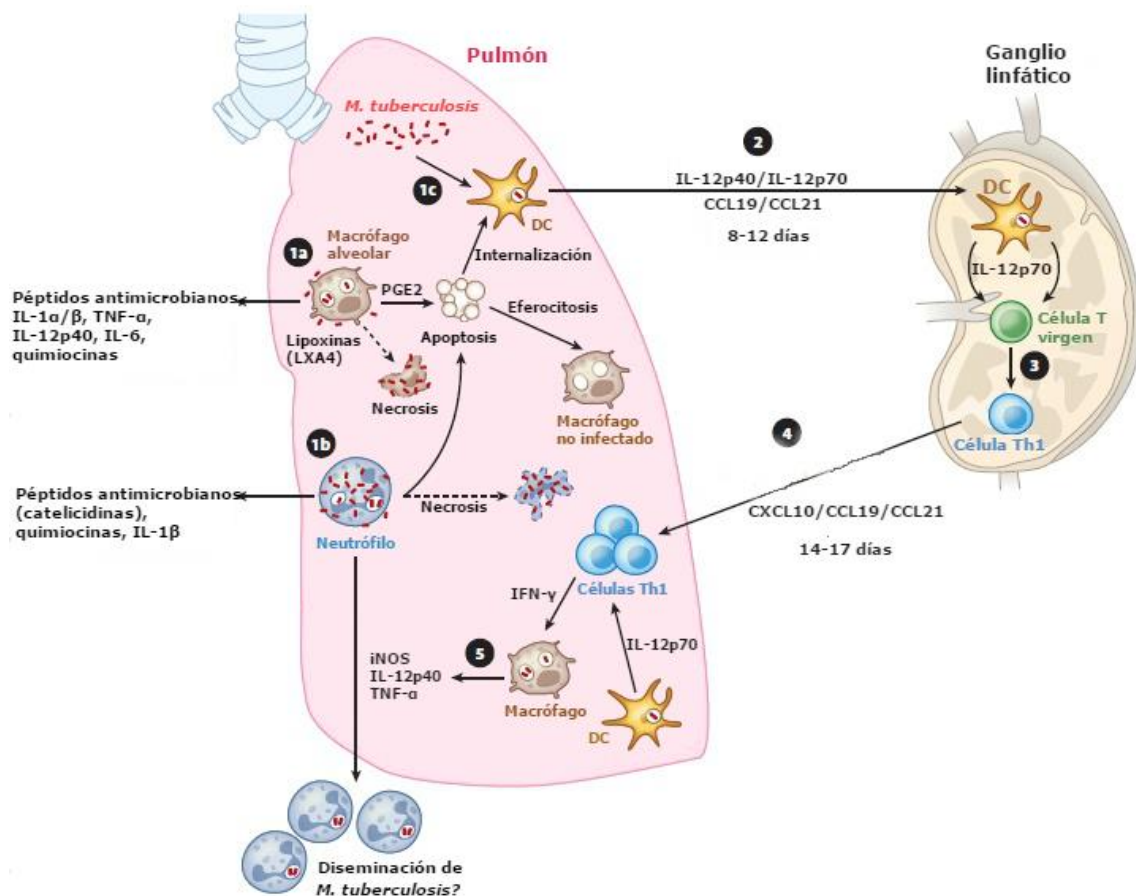


Figura 3. Respuesta inmune celular contra *Mtb*. En un comienzo, macrófagos alveolares residentes (1a), neutrófilos (1b) y células dendríticas (DCs) de pulmón (1c) son infectados, provocando la secreción y producción de péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas. El balance de mediadores lipídicos, como prostaglandina E2 o lipoxina A4, dentro del macrófago infectado determina la inducción de apoptosis o necrosis. Células apoptóticas infectadas son ingeridas por DCs de pulmón o eferocitadas por macrófagos no infectados (1c). DCs infectadas migran al ganglio linfático local de pulmón alrededor de 8-12 días post infección para inducir la diferenciación de células T vírgenes hacia un fenotipo Th1. Células Th1 protectoras migran de regreso al pulmón y producen IFN- γ , desencadenando la activación de los macrófagos, producción de citocinas y factores microbicidas incluyendo iNOS. Modificado de O'Garra y colaboradores (Garra et al., 2013).

En inmunogenética, la susceptibilidad Mendeliana a enfermedad micobacteriana implica un espectro de mutaciones genéticas en 5 genes autosómicos (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12B*, *IL12RB*) que confieren susceptibilidad a infecciones con micobacterias ambientales y BCG (Ottenhoff et al., 1998). Individuos con deficiencias en la señalización de IFN- γ , debido a mutaciones en *IFNGR1* y *IFNGR2*, presentan susceptibilidad fatal a infecciones micobacterianas (Dorman & Holland, 1998; Jouanguy et al., 1999). La producción de IFN- γ por las células CD4⁺ se encuentra ligada a una comunicación eficiente entre estas células y las DCs. *Mtb* es capaz de interferir en la unión CD40-CD40L, la cual es crucial para una correcta comunicación entre estas poblaciones celulares (Sia et al., 2017). Lo anterior resalta la gran importancia del IFN- γ en el control de la infección por *Mtb*. Sin embargo, esta citocina no puede controlar por si sola la infección, requiriendo así la cooperación de otras citocinas como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-17. Poblaciones de células CD4⁺IL-17⁺ han sido encontradas en PMBC (células mononucleares de sangre periférica) y muestras de lavado bronquio alveolar de individuos sanos vacunados con BCG, mismas que decayeron en pacientes con TB activa, sugiriendo un papel para estas células en el control de la infección (Scriba et al., 2008). No obstante, una respuesta no controlada por parte de estas células podría resultar en daño histopatológico debido a un aumento de la cantidad de neutrófilos en el sitio de la infección.

Células T CD8⁺

A través de evidencia experimental se ha comprobado la contribución de las células T CD8⁺ en la inmunidad contra *Mtb*. Ratones deficientes en TAP-1 mostraron respuestas deficientes de células CD8⁺ y sucumbieron más rápidamente a la infección por *Mtb* (Behar et al., 1999). Macacos Rhesus deficientes en células CD8⁺ también mostraron una respuesta protectora ineficiente inducida por la BCG (Chen et al., 2009). En un modelo murino de TB latente, se demostró la importancia de esta población celular en prevenir la reactivación de la enfermedad, ya que en los ratones carentes de esta población celular, se observó un aumento sustancial de la carga bacteriana de *Mtb* (Van Pinxteren et al., 2000).

La participación de las células CD8⁺ se relaciona con la secreción de citocinas como IL-2, TNF- α e IFN- γ , las cuales se sabe juegan un papel importante en el control de la infección. Asimismo, los linfocitos CD8⁺ secretan perforinas que provocan la muerte de macrófagos infectados por *Mtb* y granzimas capaces de actuar directamente sobre la micobacteria. Además, se tienen reportes del reconocimiento de péptidos de los antígenos ESAT-6, CFP-10 y el complejo Ag85 por parte de linfocitos T CD8⁺ humanos (Klein et al., 2001; Shams et al., 2004).

Células B

Durante mucho tiempo se ha denegado que la respuesta inmune humoral, a cargo de las células B, participe en la inmunidad contra *Mtb*. Sin embargo, hay evidencia que apoya un papel de las células B en la respuesta inmune en TB. Los linfocitos B pasan a formar parte del anillo linfocítico durante la formación del granuloma (Tsai et al., 2006). Además, análisis de expresión génica han revelado cambios en genes asociados a células B durante el curso de la infección (Cliff et al., 2013). Asimismo, se han encontrado anticuerpos específicos contra antígenos micobacterianos en el suero de pacientes con TB (Kunnath-Velayudhan et al., 2010), los cuales demostraron tener funciones de opsonización y protección *in vitro* (Palucci et al., 2016). Igualmente, se ha demostrado el papel de las células B en la regulación de la respuesta inflamatoria durante la enfermedad, ya que ratones carentes de dicha población celular presentaron una respuesta inflamatoria exacerbada con el subsecuente aumento en el daño histopatológico pulmonar, esto ocasionado por un aumento en el reclutamiento de neutrófilos (Kozakiewicz et al., 2013).

La producción de anticuerpos ha demostrado tener resultados variados durante la infección por *Mtb*. La unión de anticuerpos al receptor Fc γ IIB en macrófagos ocasiona una disminución en la producción de IL-12 (Maglione et al., 2008), mientras que la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales contra componentes de la pared celular puede mejorar el curso de la infección en ratones (Achkar et al., 2015).

Granuloma Tuberculoso

El granuloma tuberculoso es una estructura organizada de células inmunes que se forma debido al estímulo persistente de *Mtb*. En su formación colaboran tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. Durante el proceso de infección por *Mtb*, la micobacteria alcanza el alveolo pulmonar e infecta a los macrófagos alveolares, que inician un proceso inflamatorio provocando el reclutamiento de monocitos y neutrófilos de sangre periférica con el objetivo de eliminar a *Mtb*. En la mayoría de los casos esto no sucede y, por lo tanto, interviene la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos B y T migran al sitio de infección y forman un anillo alrededor de las células infectadas. Eventualmente, los fibroblastos presentes en el sitio de la infección crearán un anillo de colágena y fibronectina finalizando con la formación del granuloma. De manera general, el centro del granuloma estará formado por macrófagos infectados y no infectados, estos mostrarán distintos estadios de diferenciación como lo son: células gigantes multinucleadas, macrófagos espumosos y células epitelioides. Asimismo, en el centro de esta estructura aparecerán neutrófilos y células dendríticas.

El granuloma representa una estructura heterogénea (Figura 4), pudiéndose encontrar granulomas con composición celular y niveles de oxigenación diferentes (Ehlers & Schaible, 2012), así como con carga bacteriana desigual aún dentro de un mismo individuo. Del mismo modo, es una estructura dinámica donde se establece una interacción entre los factores de virulencia de *Mtb* y el sistema inmune del hospedero, lo que origina un conjunto de respuestas inflamatorias y anti-inflamatorias dentro del granuloma. Al lograrse un balance entre la respuesta inmune inflamatoria y anti-inflamatoria, el granuloma ayudará a controlar la infección y proveerá protección. Sin embargo, si no se alcanza este balance, el granuloma contribuirá a la progresión de la infección y al daño histopatológico.

En la actualidad, aún continúa el debate acerca de si la función del granuloma es brindar protección al hospedero o si contribuye a la progresión de la enfermedad y al daño histopatológico (Garra et al., 2013). Esto se basa en la heterogeneidad en la morfología de

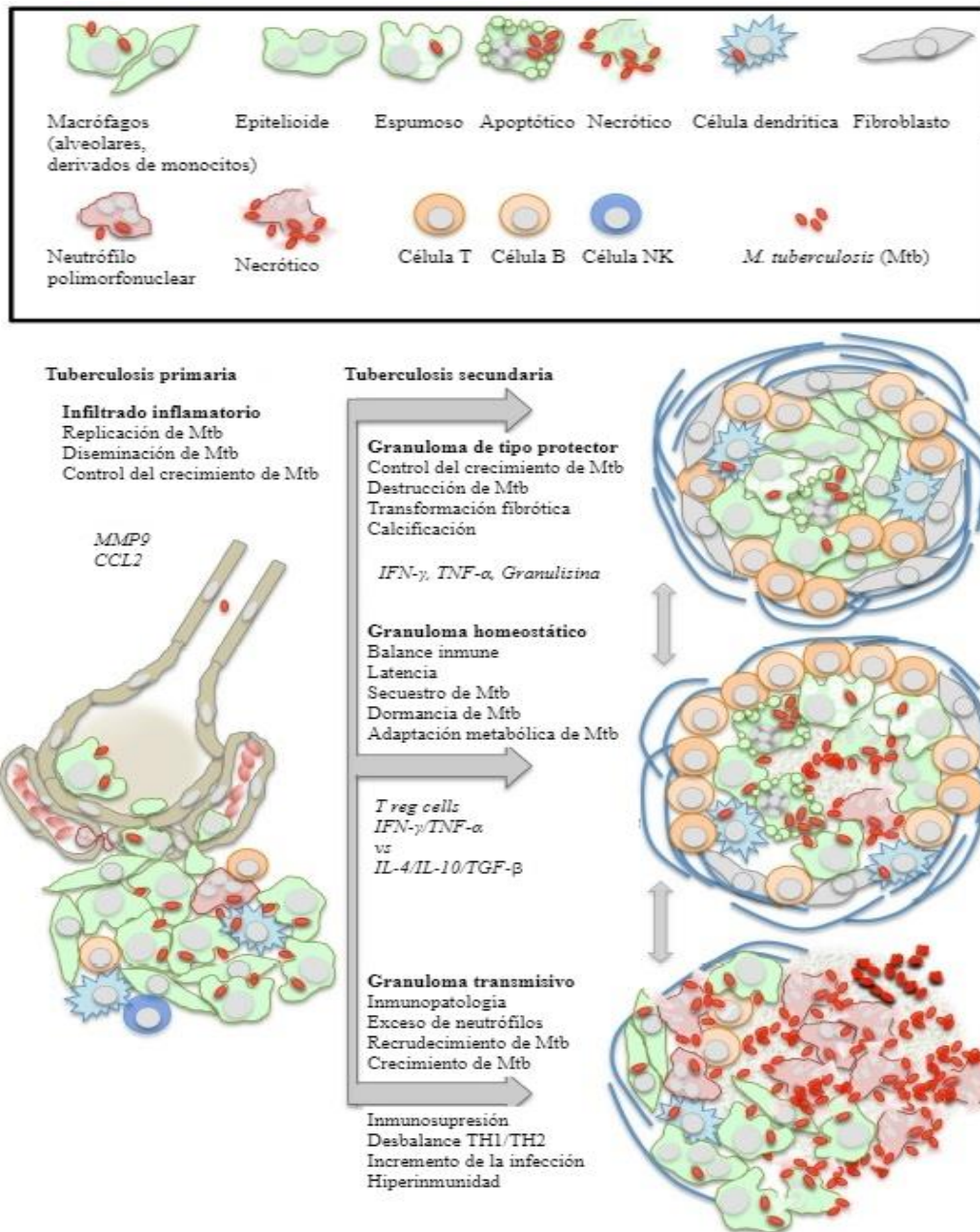


Figura 4. Patología y dinámica de la formación del granuloma en tuberculosis. *Mtb* provoca un infiltrado inflamatorio que puede dar lugar a: (i) inmunidad protectora, (ii) balance en la inflamación o (iii) transmisión endobronquial debida a necrosis en el granuloma. En *italicas* se representan mediadores típicos de la inmunidad celular y humoral que influyen en la diferenciación del granuloma. Modificado de Ehlers y Schaible (Ehlers & Schaible, 2012).

los granulomas, el papel de la inflamación, grado de hipoxia y la expresión diferencial de genes de *Mtb* dentro de los granulomas de individuos con enfermedad activa y aquellos con TB latente (Russell et al., 2009). Lo más probable es que se establezca una interacción homeostática que convierta al granuloma en un nicho adecuado para la supervivencia a largo plazo de *Mtb*, brindando al mismo tiempo protección al hospedero (Ramakrishnan, 2012).

Proteína PE_PGRS33 de *Mtb*

En el año de 1998, Cole y colaboradores reportaron la secuencia genómica completa de *Mtb* (Cole et al., 1998). Este conocimiento guió al hallazgo de alrededor de 100 genes que codifican para la familia de proteínas PE (Dheenadhayalan et al., 2006). En general, todos los miembros de esta familia se caracterizan por poseer un extremo N-terminal altamente conservado. Dentro de la familia PE se encuentra la subfamilia PE_PGRS, cuyos miembros se distinguen por poseer un extremo N-terminal altamente conservado de alrededor 110 aminoácidos, así como un dominio PGRS sumamente polimórfico que contiene en su estructura múltiples repeticiones de los aminoácidos glicina y alanina (Cascioferro et al., 2007; Meena, 2015). Esta subfamilia consta de 65 miembros (Cadieux et al., 2011), y algunos han sido estudiados en busca de sus propiedades inmunogénicas. En este contexto, la proteína PE_PGRS33 es hasta el momento una de las más estudiadas.

La proteína PE_PGRS33 es codificada por el gen Rv1818c y consta de 499 aminoácidos (Vallecillo & Espitia, 2009). Su dominio PE se encuentra anclado a la pared celular micobacteriana y el dominio PGRS se ubica en el medio extracelular (Zumbo et al., 2013).

Mediante diversos estudios se han podido conocer algunas de las características de esta proteína (Figura 5). Delogu y colaboradores obtuvieron las primeras evidencias de que PE_PGRS33 es capaz de despertar una respuesta inmune en un modelo murino (Delogu & Brennan, 2001). Además, se ha determinado que su dominio PE induce una respuesta inmune celular mientras que el dominio PGRS induce una de tipo humoral (Cohen et al., 2014; Delogu & Brennan, 2001).

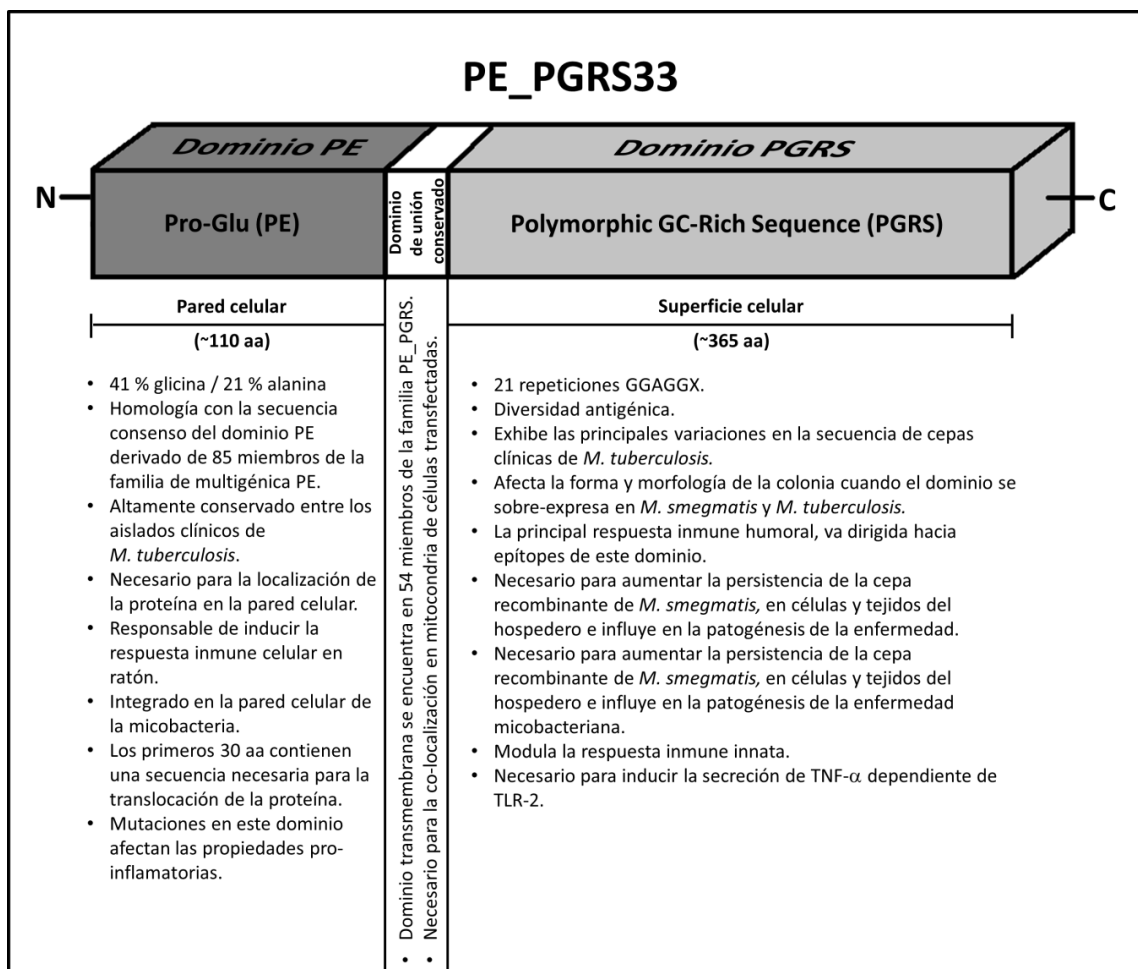


Figura 5. Características estructurales y propiedades inmunogénicas de la proteína PE_PGRS33. La proteína PE_PGRS33 está compuesta de un dominio N-terminal altamente conservado y un dominio C-terminal sumamente polimórfico, ambos entrelazados mediante un dominio de unión conservado. Modificado de Gastélum y colaboradores (Gastelum-Aviña et al., 2015).

PE_PGRS33 es capaz de interactuar con TLR-2 provocando la secreción de TNF- α por macrófagos, así como la inducción de apoptosis al interactuar con la mitocondria de estas células (Basu et al., 2007; Cadieux et al., 2011). La interacción de esta proteína con TLR-2 también se encuentra implicada en el ingreso de *Mtb* hacia el interior de los macrófagos (Palucci et al., 2016), otorgándole a PE_PGRS33 un papel directo en el proceso de infección por parte de la micobacteria.

Por otro lado, en un modelo *in vitro* de infección de macrófagos con cepas recombinantes de *M. smegmatis*, se comparó la respuesta inmune de tres miembros de la subfamilia PE_PGRS y se demostró la capacidad inmunomoduladora de PE_PGRS33, pues al evaluar la secreción de citocinas de los macrófagos infectados con las distintas cepas recombinantes se detectó un aumento en los niveles de IL-12 y especies reactivas del nitrógeno y una disminución en la secreción de IL-10 (Singh et al., 2008). PE_PGRS33 podría ayudar a controlar la infección por *Mtb*, como lo demuestran ensayos *in vivo* donde ratones infectados con *Mtb* e inmunizados con PE_PGRS33, presentaron mayor capacidad de controlar el crecimiento de la micobacteria en el pulmón, así como una disminución del daño histopatológico en dicho órgano (Delogu et al., 2017). Además, estudios *in vitro* muestran que *Mtb* expresa esta proteína cuando se cultiva bajo condiciones inducidas de estrés (Brennan, 2006), afirmando que esta proteína podría también estar presente durante la forma latente de la TB.

Estudios con sueros de pacientes con TB han revelado la presencia de anticuerpos contra PE_PGRS33 (Narayana et al., 2007), lo que pone de manifiesto la habilidad de esta proteína de originar una respuesta inmune humoral durante el curso de la infección. Estos anticuerpos podrían estar ejerciendo una actividad neutralizante en contra de la micobacteria (Minerva et al., 2017).

Es ampliamente aceptado que la respuesta inmune celular resulta indispensable para un buen control de la infección por *Mtb*, siendo esta respuesta iniciada con la activación de células T antígeno específicas. En este contexto, PE_PGRS33 puede ser de gran utilidad debido a los epítopes conservados de células T contenidos en su dominio PE

(Copin et al., 2014). En relación con estudios de respuesta inmune hacia péptidos de esta proteína, hay algunos estudios que reportan la identificación de péptidos restringidos al MHC-I y su habilidad de inducir *in vitro* la activación de células T de pacientes con TB e individuos sanos PPD⁺ (Chaitra et al., 2005a, 2008). Recientemente, se identificaron péptidos inmunogénicos de PE_PGRS33 restringidos al MHC-II con la capacidad de inducir la secreción de IFN- γ en células T CD4⁺ de individuos con TB latente (Ortega-Tirado, Niño-Padilla, et al., 2020).

La Vacuna BCG y su Eficacia

La vacuna BCG proviene de una versión atenuada de *Mycobacterium bovis*, el agente causante de la tuberculosis bovina (Kaufmann et al., 2017). En el Instituto Pasteur, durante 13 años, Albert Calmette y Camille Guérin realizaron 230 pases de esta bacteria hasta que obtuvieron una cepa menos virulenta (Brazier & McShane, 2020). En 1924, el Instituto Pasteur comenzó a distribuir la cepa de la vacuna a diferentes laboratorios en todo el mundo y, desde entonces, se han derivado distintas cepas. Hoy en día, las cepas derivadas más comunes utilizadas para la producción de vacunas son BCG Pasteur 1173P2, BCG Danish 1331, BCG Glaxo 1077 y BCG Japan 172 (Li et al., 2020). Desde su primera aplicación en 1921, BCG ha demostrado su eficacia en la protección contra la TB meníngea y miliar en lactantes. En 1974, la OMS incluyó la vacuna BCG en su Programa Ampliado de Inmunización (Brazier & McShane, 2020).

Hoy, la BCG es la vacuna más utilizada en todo el mundo, encontrándose vacunada casi el 90% de la población mundial (Brazier & McShane, 2020). A pesar de su efectividad contra la TB durante la infancia, la protección de BCG contra la TB pulmonar en adultos es muy variable, lo cual es preocupante porque el mayor número de casos de TB pulmonar ocurre en la población adulta. La protección ofrecida por BCG va del 0% al 80% (Andersen & Scriba, 2019) y tiende a durar entre 10 y 15 años (Abubakar et al., 2013). La variabilidad en la protección está relacionada principalmente con la latitud debido a la presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) (Abubakar et al., 2013). La proporción de MNT es mayor en las zonas tropicales cercanas al ecuador en comparación con las

zonas de clima templado, y la efectividad de la BCG tiende a ser menor en las regiones cercanas al ecuador (Abubakar et al., 2013).

La influencia de MNT en la eficacia de BCG puede explicarse por dos teorías: enmascaramiento y bloqueo (Andersen & Doherty, 2005). La teoría del enmascaramiento sugiere que la exposición previa a MNT induce una respuesta inmune que evita cualquier efecto adicional de la BCG (Andersen & Doherty, 2005). Esto podría explicar el hecho de que la BCG es efectiva en recién nacidos que no han estado expuestos a MNT y, por el contrario, no es efectiva en adultos previamente expuestos. La teoría del bloqueo establece que una exposición previa a MNT provoca una respuesta inmune frente a antígenos comunes a *Mtb* (Brandt et al., 2002). Esta respuesta inmune bloquea la replicación de BCG, lo cual conduce a una falta de respuesta inmune y memoria inmunológica (Brandt et al., 2002).

La información anterior destaca la necesidad de desarrollar una nueva vacuna más eficiente para controlar la TB y superar las desventajas que impone la exposición a MNT, en este sentido, la inmunoinformática podría ofrecer una solución. La inmunoinformática puede ayudar a encontrar proteínas que solo se expresen en *Mtb* y no en MNT, lo que significa que una respuesta inmune previa a MNT no afectaría la eficacia de una vacuna basada en proteínas (Brandt et al., 2002). La inmunoinformática no sólo se limita a detectar proteínas sino también péptidos inmunogénicos de células T. En la actualidad, se han desarrollado varias herramientas que hacen posible el análisis y descubrimiento de muchas proteínas y péptidos inmunogénicos de un patógeno con el objetivo de desarrollar nuevas vacunas.

Respuesta Inmune a la Vacuna BCG

La respuesta inmune inducida por la BCG comienza en el sitio de inoculación, donde macrófagos, neutrófilos y DCs residentes interactúan con la micobacteria (Dockrell & Smith, 2017; Moliva et al., 2017). Esta interacción es mediada por receptores de reconocimiento de patrones (PPRs, por sus siglas en inglés) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) presentes en la pared

celular de BCG, tal como peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos (Dockrell & Smith, 2017). Entre los receptores celulares involucrados en el reconocimiento de BCG por parte del sistema inmune, se encuentran TLR-2 y TLR-4; estos receptores pueden reconocer diferentes proteínas de BCG e inducir la maduración de macrófagos y DCs, así como la secreción de citocinas proinflamatorias (Dockrell & Smith, 2017). Los receptores del complemento C3 y C4 promueven el reconocimiento de micobacteria opsonizada por DCs (Covián et al., 2019).

Además, determinados receptores presentes en el citosol de las células inmunes innatas, como NOD-2, pueden detectar componentes específicos del peptidoglicano micobacteriano (Gagliardi, 2005). Asimismo, receptores de lectinas tipo C, como DC-SIGN, interactúan con componentes de la pared celular bacteriana promoviendo el reconocimiento e internalización de la bacteria (Gagliardi, 2005). Una vez internalizada por las DCs, BCG puede sobrevivir hasta dos semanas dentro de estas células (Jiao et al., 2002). Durante este período se induce la maduración y migración de DCs, caracterizados por la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD83, CD80 y CD86.

La respuesta inmune adaptativa comienza cuando las células presentadoras de antígeno presentan péptidos antigénicos a las células T en los órganos linfoides secundarios (Figura 6). Se ha demostrado que las DCs de la piel infectadas con BCG migran a órganos linfoides secundarios donde secretan TNF- α , IL-6 e IL-12 y activan tanto a células T CD4⁺ como CD8⁺ (Tsuji et al., 2000).

La respuesta inmune adaptativa inducida por la vacunación con BCG envuelve la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ (Kaufmann, 2013) en conjunto con una elevada producción de IFN- γ , incrementando la actividad anti-micobacteriana de los macrófagos (Bertholet et al., 2008; Kaufmann, 2013). Esta citocina juega un papel adicional en la activación de células B antígeno-específicas con la subsecuente generación de anticuerpos por células plasmáticas (Covián et al., 2019).

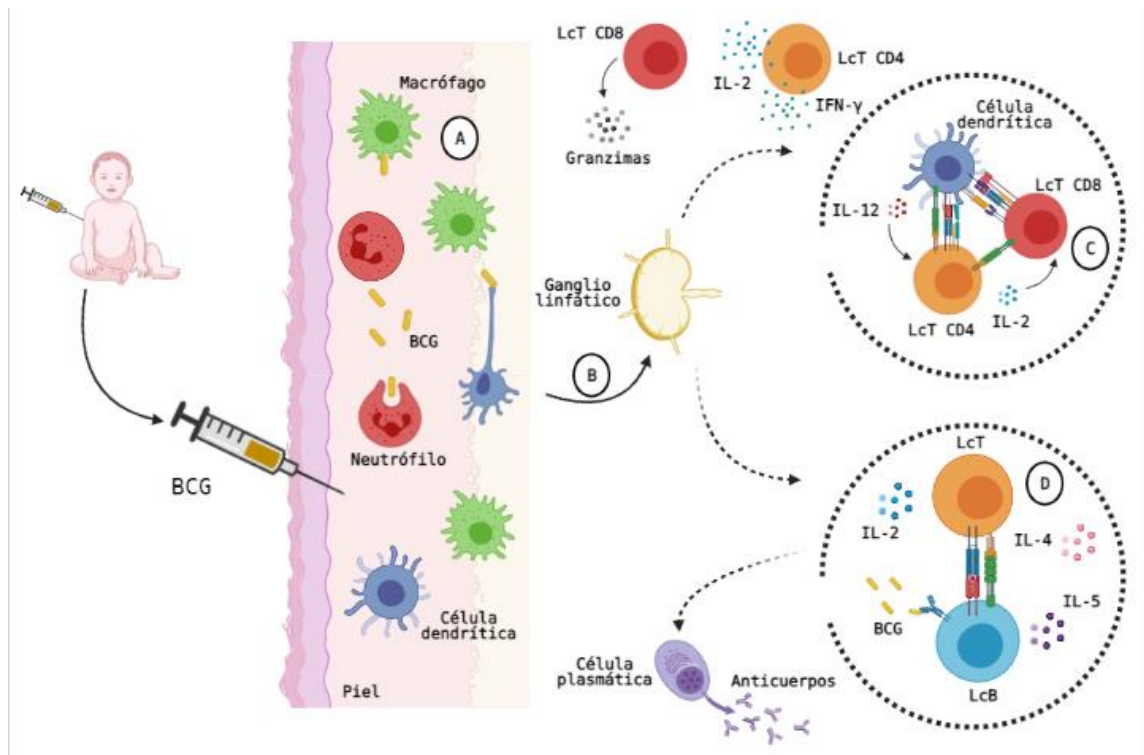


Figura 6. Respuesta inmune hacia BCG después de la vacunación de un neonato. **(A)** Reconocimiento de BCG en el sitio de inoculación por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. **(B)** Células dendríticas activadas migran de la piel hacia los ganglios linfáticos para activar células inmunes adaptativas. **(C)** Activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno-específicas con un perfil Th1, secretando grandes cantidades de IFN-γ y granzimas. **(D)** Activación de células B que guía a la generación de células plasmáticas y de memoria y a la producción de anticuerpos antígeno-específicos. Modificado de Covián y colaboradores (Covián et al., 2019).

Después de la vacunación, en fases tempranas, es posible detectar la presencia de un conjunto de linfocitos T CD8⁺ con capacidad de proliferar, estos se encuentran en sangre periférica hasta por 10 semanas después de la vacunación (Hanekom, 2005). Igualmente, se han encontrado linfocitos T CD4⁺ que secretan IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Soares et al., 2013). Durante la fase de contracción de la respuesta inmune, las células T CD4⁺ y CD8⁺ adoptan un fenotipo de memoria, con características funcionales de células T efectoras de memoria secretoras de IFN- γ (Soares et al., 2013). Estas células tienen la capacidad de reconocer antígenos micobacterianos y promover una fuerte respuesta proliferativa varios meses después de la vacunación (Covián et al., 2019).

Inmunoinformática en la Predicción de Péptidos de Células T

La vacunación se ha convertido en uno de los métodos más eficientes para prevenir y erradicar enfermedades infecciosas (Lin et al., 2008). Desde su creación, las vacunas atenuadas han sido el tipo más común; estas consisten en preparaciones basadas en la versión atenuada del patógeno. Sin embargo, el uso del patógeno completo conlleva problemas relacionados a la seguridad de la vacuna (Dhanda et al., 2017).

Una alternativa son las preparaciones a base de subunidades del patógeno, por ejemplo, las vacunas basadas en péptidos de células T. Estas vacunas son seguras porque no contienen microorganismos viables y no inducen el desarrollo de enfermedad (Patronov & Doytchinova, 2013). Además, estos péptidos son moléculas estables y fáciles de producir (Patronov & Doytchinova, 2013). Para el desarrollo de una vacuna basada en péptidos es necesario identificar los péptidos con potencial de inducir la respuesta inmune más efectiva en contra de la infección. Para muchas infecciones intracelulares, como la TB, la respuesta inmune celular es la más eficiente en controlar la infección. La respuesta inmune celular se encuentra a cargo de las células T, tanto CD4⁺ como CD8⁺. Por consiguiente, la búsqueda debe centrarse en aquellos péptidos capaces de activar a estas poblaciones celulares.

La identificación de péptidos inmunogénicos puede realizarse de manera rápida y eficiente mediante inmunoinformática, es decir, la aplicación de herramientas

computacionales para la resolución de problemas relacionados a la inmunología (Backert & Kohlbacher, 2015). Entre estas herramientas se encuentran programas capaces de predecir los péptidos de un antígeno con mayor probabilidad de generar una respuesta inmune. La mayoría de estos programas se basan en seleccionar los péptidos con mayor probabilidad de unión a moléculas de MHC I y MHC II. Cada uno de ellos se basa en distintos algoritmos de predicción, los cuales determinarán su exactitud. En la tabla I se enlistan algunos de los programas utilizados para predecir péptidos inmunogénicos de células T.

La aplicación de la inmunoinformática en la predicción de péptidos de células T ha hecho posible el estudio de la respuesta inmune en muchas enfermedades infecciosas, así como en no infecciosas como cáncer y Alzheimer; todo enfocado en el desarrollo de nuevas vacunas. Por ejemplo, 21 péptidos inmunogénicos para células CD8⁺, junto con 14 para células CD4⁺, fueron seleccionados de 14 diferentes proteínas de *Anopheles stephensi* para diseñar una vacuna contra el género *Plasmodium* (Pandey et al., 2018). En otro estudio identificaron 21 péptidos restringidos al MHC I de siete proteínas del virus de Epstein-Barr, todos con el potencial de formar parte de una vacuna (Ali et al., 2019). Mediante técnicas inmunoinformáticas se identificaron también seis péptidos de antígenos de *Leishmania donovani*, que indujeron la secreción de IFN- γ por células CD4⁺ de pacientes con leishmaniasis visceral (Dikhit et al., 2017). Para la enfermedad de la influenza se desarrolló la vacuna M-0001, la cual contiene péptidos conservados de proteínas de los virus de influenza A y B (Van Doorn et al., 2017).

Para el tratamiento del virus de la hepatitis C se desarrolló la vacuna IC41, que consiste de cinco péptidos sintéticos del virus (Firbas et al., 2006). En el caso de la enfermedad de Alzheimer, las estrategias inmunoterapéuticas se han centrado en el estudio de las proteínas amiloide (A β) y Tau (Malonis et al., 2020). Algunos ejemplos son la vacuna ABvac40 específica para el extremo C-terminal de A β ₄₀ (Lacosta et al., 2018), y la vacuna AADvac1 específica para un péptido de la proteína Tau (Kontsekova et al., 2014; Novak et al., 2018).

Tabla I. Programas de predicción para identificar péptidos de células T con unión al MHC

Programa de predicción	MHC	Fuente de MHC	Algoritmo	Sitio web
SYFPEITHI	I, II	Humano, ratón, rata	QM	http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm
SVMHC	I, II	Humano, ratón,	SVM	https://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SVMHC/
ProPred	II	Humano,	QM	http://crdd.osdd.net/raghava/propred/
ProPred I	I	Humano, ratón	QM	http://crdd.osdd.net/raghava/propred1/
MHC2Pred	II	Humano, ratón, rata	SVM	http://crdd.osdd.net/raghava/mhc2pred/
nHLAPred	I	Humano, ratón	ANN, QM	http://crdd.osdd.net/raghava/nhlapred/
NetMHCpan 4.0	I	Humano, ratón, cerdo, chimpancé, gorila de tierras bajas, macaco rhesus	ANN	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/
RANKPEP	I, II	Humano, ratón	PSSM	http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html
EpiMatrix	I, II	Humano	QM	http://i-cubed.org/tools/ivax/ivax-tool-kit/epimatrix/
IEDB-AR	I, II	Humano, ratón, vaca, gorila, cerdo, rata, macaco, chimpancé	ANN, SVM	http://tools.iedb.org/main/tcell/
BIMAS	I	Humano	QM	http://bimas.dcrtnih.gov/molbiothe/hla_bind/
TEPITOPEpan	II	Humano	PSSM	http://datamining-iip.fudan.edu.cn/service/TEPITOPEpan/index.html
NetMHCIIpan 3.2	II	Humano, ratón	ANN	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/
NetMHCII 2.0	II	Human, ratón	ANN	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII-2.0/
NetMHC 4.0	I	Humano, ratón, chimpancé, macaco rhesus	ANN	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/
Tepredict	I, II	Humano	ANN, QM	http://tepredict.sourceforge.net/

ANN, artificial neural network. PSSM, position specific scoring matrix. QM, quantitative matrix. SVM, support vector machine. Modificado de (Ortega-Tirado, Arvizu-Flores, et al., 2020)

En la inmunología del cáncer, las vacunas a base de péptidos de células T están siendo ampliamente utilizadas como inmunoterapia en contra de diferentes tipos de cáncer. Un ejemplo es el ensayo clínico aplicado en mujeres con cáncer de mama, donde evaluaron el efecto de una vacuna desarrollada a base de péptidos restringidos a moléculas de MHC I y MHC II, todos derivados de la proteína He2r/neu (Koski et al., 2012).

Para el caso de la TB, aún no se cuenta con alguna vacuna a base de péptidos de células T en fase clínica (Fatima et al., 2020; Li et al., 2020; Soundarya et al., 2019). Sin embargo, existen estudios acerca de la respuesta inmune hacia péptidos micobacterianos de células T. En estos estudios se utilizaron distintos programas de predicción para identificar péptidos inmunogénicos de células T de antígenos de *Mtb*; con la finalidad de encontrar potenciales candidatos para el desarrollo de una nueva vacuna contra la TB. En la tabla II se enlistan algunos de estos estudios.

Tabla II. Identificación de péptidos inmunogénicos de células T de antígenos de *Mtb*.

Programa de predicción	Proteínas de <i>Mtb</i>	Análisis	Resultados	Validación de resultados
BIMAS	52 proteínas secretoras	Nonámeros superpuestos de cada proteína con unión a cualquiera de 33 alelos de MHC I	50% de péptidos unidos al MHC con tiempo de disociación media $T_{1/2} \geq 100$ min. 73% fueron monoalélicos	Comparación con péptidos con unión al MHC I comprobada experimentalmente
BIMAS	41 proteínas PKS y NRPS	Nonámeros superpuestos de cada proteína con unión a cualquiera de 33 alelos de MHC I	20% de péptidos unidos al MHC con tiempo de disociación media $T_{1/2} \geq 100$ min. 77% fueron monoalélicos	Análisis de “docking” de la interacción de los péptidos con alelos HLA (A_0201, B_2705, B-5101)
EpiMatrix	73 proteínas secretoras	Comparación con una lista de motivos de unión al MHC II	29 péptidos seleccionados para síntesis	Detección de IFN- γ en PBMC de individuos sanos por ELISpot
ProPred	PPE68	Identificación de péptidos promiscuos para HLA-DR	Detección de cuatro péptidos promiscuos. Uno clasificado como inmunodominante.	Evaluación de IFN- γ en PBMC de individuos vacunados con BCG
ProPred	LppX	Identificación de péptidos promiscuos para HLA-DR	Detección de ocho péptidos promiscuos	Análisis de proliferación y secreción de IFN- γ en PBMC de individuos vacunados con BCG
ProPred	Ag85B	Identificación de péptidos promiscuos para HLA-DR	15 de 31 péptidos con unión a HLA-DR. Cuatro considerados promiscuos	Análisis de proliferación de células T inducida por los péptidos
IEDB-AR, TEpredict SYFPEITHI, BIMAS, NetCTL 1.2	Rv2351c	Identificación de péptidos restrictos al MHC I	20 péptidos con capacidad de unión a alelos del MHC I	Detección de IFN- γ en PBMC humanas por ELISpot
	CFP21	Predicción de péptidos restrictos a HLA-A*0201	Cuatro péptidos con unión a HLA-A*0201	Detección de IFN- γ en células humanas CD8 ⁺ por ELISpot
TEPITOPE	Familia de proteínas Mce	Identificación de péptidos restrictos al MHC II	Cuatro péptidos promiscuos con unión a alelos HLA-DR	Evaluación de proliferación de células CD4 ⁺ humanas
NetMHCIIpan	Rv3804c, Ag85A	Predicción de péptidos restrictos a HLA-DRB1*09:01	18 péptidos identificados	Estudio de células CD4 ⁺ de pacientes con TB: IFN- γ por ELISA y ELISpot y evaluación de proliferación celular
MOTIFS software	Ag85B	Predicción de péptidos restrictos a HLA-A*0201	30 péptidos seleccionados.	

Tabla II. Identificación de péptidos inmunogénicos de células T de antígenos de *Mtb* (Continuación).

Programa de predicción	Proteínas de <i>Mtb</i>	Análisis	Resultados	Validación de resultados
ProPred, ProPred I	CIP50, Rv2251	Predicción de péptidos promiscuos restringidos a alelos del MHC I y MHC II	Identificación de cuatro péptidos promiscuos	Análisis de secreción de IFN- γ y TNF- α por ELISA
ProPred	MPT64	Identificación de péptidos promiscuos restringidos a alelos HLA-DR	Detección de ocho péptidos	Análisis de proliferación celular y evaluación de secreción de IFN- γ
ProPred I	Rv3852, Rv2706c, Rv2661c, Rv3466	Predicción de péptidos restringidos al MHC I	Identificación de 19 péptidos promiscuos	Sin ensayo de validación reportado
Propred	ESAT-6, CFP10, MPT70	Detección de péptidos promiscuos para alelos HLA-DR	Siete péptidos identificados	Evaluación de secreción de IFN- γ y proliferación en PBMC de individuos sanos
NetMHC 3.4, ProPred, IEDB	Proteínas del operón <i>mymA</i>	Identificación de péptidos restringidos al MHC I y MHC II	142 péptidos para MHC II y 41 para MHC I	Análisis de “docking” de los péptidos de la proteína Rv3083 protein
NetMHCpan 3.0, NetCTLpan I	Mtb32A, Mtb39A, Mtb72F	Detección de péptidos restringidos al MHC I y MHC II	Identificación de péptidos para 158 alelos DRB1 en población con alta incidencia de TB. Detección de péptidos para tres supertipos de alelos del MHC I (A02, A03, B07)	Comparación con péptidos con unión al MHC I comprobada experimentalmente
Propred	MPT63	Predicción de péptidos para alelos HLA-DR	Identificación de 10 péptidos promiscuos	Evaluación de secreción de IFN- γ y proliferación en PBMC de individuos sanos vacunados con BCG
BIMAS	Familia de proteínas PPE and PE	Identificación de péptidos restringidos al MHC I	Detección de 22 péptidos promiscuos	Análisis estructural mediante modelado molecular
BIMAS	Rv1818c, Rv3812, Rv3018c	Detección de péptidos restringidos a HLA-A*0201	Identificación de tres péptidos con capacidad de unión a HLA-A*0201	Evaluación de respuesta de células T antígeno-específicas en PBMC de individuos sanos y con TB
SYFPEITHI, MOE	PE_PGRS33	Identificación de péptidos inmunogénicos con unión a I-A ^k	Detección de cinco péptidos. Síntesis de los tres con mayor estabilidad de unión	Evaluación de células T CD4 ⁺ /IFN- γ ⁺ en individuos con TB latente

Modificado de (Ortega-Tirado, Arvizu-Flores, et al., 2020)

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de Péptidos Inmunodominantes de la Proteína PE_PGRS33 Mediante Inmunoinformática

Predicción de Péptidos de Células T Restringidos a Moléculas de MHC-II

Se realizó una predicción de los péptidos de células T de PE_PGRS33 con la mayor probabilidad de interactuar con la molécula I-A^k. La predicción fue hecha utilizando la base de datos SYFPHEITHI (Dikhit et al., 2017) (<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>) y la secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33 de *Mtb* (No. acceso ALB18981.2). La base de datos posee un sistema de puntaje que evalúa cada aminoácido de un péptido. A los aminoácidos se les asigna un valor arbitrario que puede ser de 1 hasta 15, dependiendo de su capacidad para interactuar con su respectiva cavidad dentro de la molécula de clase II. Valores negativos también pueden ser asignados a aminoácidos que disminuyan la capacidad de unión del péptido. La asignación de valores está basada en la frecuencia con la que aparece el aminoácido en ligandos naturales, epítopes de células T o péptidos de unión. La exactitud de las predicciones es de aproximadamente 50% (Rammensee et al., 1999).

Construcción de Modelados de Homología de los Péptidos Inmunodominantes de la Proteína PE_PGRS33

Se crearon modelados de homología para analizar las interacciones entre la secuencia de aminoácidos de los péptidos y la molécula I-A^k. Se utilizó el programa MOE v2018.01 para construir los modelados (Pacheco-Sánchez et al., 2014); como templete, se usó la estructura cristalográfica de la molécula de I-A^k acoplada al péptido inmunodominante (DYGILQINS₅₂₋₆₀) de la lisozima de huevo de gallina, depositada bajo el código PDB 1IAK (Fremont et al., 1998). Para la construcción de los modelados, se empleó sólo el núcleo peptídico de cada péptido. Este núcleo peptídico consta de los nueve aminoácidos que interaccionan con la hendidura de unión de la molécula I-A^k (Fremont et al., 1998).

Predicción de Alergenicidad y Reactividad Cruzada de PE_PGRS33 y sus Péptidos con Proteínas Humanas

Se empleó la herramienta BLAST v2.8.1 (Yang et al., 2014) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) para llevar a cabo una búsqueda de homología de secuencias entre PE_PGRS33 y sus péptidos con proteínas humanas. El alineamiento de las proteínas se realizó con el algoritmo blastp bajo los parámetros predeterminados. Con el objetivo de predecir posibles sitios alérgicos en PE_PGRS33 y sus péptidos, se empleó el servidor AlgPred (Saadi et al., 2017) (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred/submission.html>) utilizando su herramienta híbrida (IgE epitope+ARPs BLAST).

Predicción del Perfil de Unión a HLA y Cálculo del Porcentaje de Cobertura Poblacional de los Péptidos Inmunodominantes de PE_PGRS33

Para determinar el perfil de unión de los péptidos inmunogénicos hacia alelos HLA de clase II se utilizó la base de datos IEDB (Immune Epitope Database, por sus siglas en inglés) (<http://tools.iedb.org/mhcii/>). La predicción se realizó con base en un conjunto de referencia de alelos HLA (Greenbaum et al., 2011). Los péptidos con un rango percentil mayor o igual a cinco fueron descartados (Shah et al., 2018).

El porcentaje de cobertura poblacional (PCP) se calculó con la base de datos IEDB (http://tools.iedb.org/tools/population/iedb_input). El PCP se determinó a escala global, así como de manera específica para los siete países donde se concentra la mayoría de los casos de TB.

Evaluación de la Respuesta Inmune Hacia la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes

Aspectos Éticos

El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora. Se obtuvo consentimiento informado de parte de los participantes.

Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)

Se obtuvo una muestra de 25 mL de sangre venosa heparinizada de un individuo aparentemente sano, vacunado con BCG. La sangre fue diluida con 25 mL de regulador de fosfatos salino (PBS) y el volumen resultante se dividió en tubos cónicos de 15 mL (Becton and Dickinson) a los que previamente se les añadió 5 mL de ficoll (Sigma-Aldrich). Las muestras fueron centrifugadas a 480 xg por 30 minutos a 25 °C. Enseguida, la fracción de PBMC se separó y lavó dos veces con 25 mL de PBS. Las células se resuspendieron en medio DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma Aldrich)] suplementado con 10% de SFB [suero fetal bovino (Gibco)] inactivado por calentamiento.

Finalmente, las células se colocaron en una caja de cultivo celular de 25 cm² (Corning) y se colocaron en cultivo a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad por 2 h.

Aislamiento de Monocitos de PBMC

Después de 2 horas, las células no adherentes (linfocitos) se transfirieron a una segunda caja de cultivo celular de 75 cm² (Corning) y se mantuvieron en cultivo por 72 h. Las células adherentes se lavaron dos veces con solución balanceada de Hanks (HBSS, por sus siglas en inglés) suplementada con SFB al 2%. Después, los monocitos se despegaron utilizando 10 mL de solución de EDTA frío (ácido etilendiaminotetraacético) 2.5 mM por cinco minutos y se lavaron dos veces con 25 mL de HBSS frío. Posteriormente, se colocaron 5x10⁴ monocitos/pozo en una placa de 48 pozos y se les permitió adherirse a la superficie durante toda la noche.

Estimulación de Monocitos Humanos con la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes

Una vez adheridos los monocitos, se procedió a estimularlos con PE_PGRS33 y los tres péptidos inmunodominantes a 10 µg/mL por 48 h. Asimismo, como control positivo, se estimuló con IFN-γ a 5 µg/mL durante 48 h.

De igual manera, se evaluó una condición donde los monocitos fueron previamente estimulados con IFN- γ (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h para posteriormente retirar el estímulo y estimular con PE_PGRS33 y los péptidos inmunodominantes (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 24 h adicionales.

El sobrenadante se recolectó a las 48 h y se analizó la secreción de TNF- α por la técnica de ELISA mediante el uso de un kit comercial (Beckton and Dickinson), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Establecimiento de un Modelo Humano de Infección *in vitro* con *Mycobacterium bovis* BCG (*M. bovis* BCG)

Una vez que se separaron los monocitos, como se describió anteriormente, se colocaron 5×10^4 monocitos por pozo en una placa de 48 pozos. Se permitió la adherencia de las células durante la noche y se procedió a estimularlas con IFN- γ recombinante, a concentraciones de 5, 2.5 y 1.25 ng/mL por 48 h.

Pasadas 48 h, se lavaron las células tres veces con 1 mL de PBS 1x para retirar el estímulo. Enseguida, se procedió a infectar los monocitos con *M. bovis* BCG a distintas MOI: 10, 5, 2.5 y 1. Después de 4 h, las células se lavaron tres veces con 1 mL de PBS 1x para retirar la bacteria remanente. Finalmente, se añadieron 4.5×10^5 linfocitos a cada pozo y las células se incubaron durante 6 días a 37°C/5 % CO $_2$. Se estimuló con PMA a 1 ng/mL como control positivo.

Después de 6 días se retiró el sobrenadante para evaluar la presencia de IFN- γ por la técnica de ELISA.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba U de Mann-Whitney, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de Péptidos Inmunodominantes de Células T de la Proteína PE_PGRS33

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por el reconocimiento de pequeñas porciones de moléculas llamadas epítopes (Turner et al., 2001). En el caso de las células T, el reconocimiento de estos pequeños péptidos ocurre unidos a moléculas del MHC. Las células T CD4⁺ o cooperadoras generalmente reconocen péptidos de entre 12-25 aminoácidos de longitud, acoplados a moléculas del MHC II (Turner et al., 2001). Debido al papel central de los epítopes de células T en la generación de una inmunidad protectora, existe el interés en identificar tales epítopes en proteínas microbianas para su posterior inclusión en vacunas de subunidades (Halling-brown et al., 2008). Los métodos de predicción *in silico* permiten acelerar el proceso de identificación.

En el presente trabajo se utilizó la base de datos SYFPHEITHI para identificar los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33. La base de datos determina los péptidos con la mayor probabilidad de unirse a una molécula del MHC-II. Dicha base de datos compara la habilidad de todos los péptidos de interactuar con la hendidura de unión de una molécula del MHC-II. Acorde a esto, los péptidos que mejor interactúen con la hendidura de unión serán aquellos con la mayor probabilidad de unirse a la molécula.

SYFPHEITHI predice péptidos de 15 aminoácidos de longitud, con un núcleo peptídico de nueve aminoácidos al centro y tres residuos de anclaje en cada extremo del péptido. El análisis identificó cinco péptidos con alto potencial de unión a la molécula de clase II I-A^k. En la tabla III se muestran los puntajes y las posiciones de los péptidos dentro de la secuencia de aminoácidos de PE_PGRS33, a mayor valor del puntaje, mayor la probabilidad de unión del péptido a la molécula I-A^k.

Tabla III. Péptidos inmunodominantes de células T de PE_PGRS33.

Secuencia de aminoácidos	Posición	Puntaje
G VLDVIN A PALALLG ₁₀₀₋₁₁₄	100	24
AA A DEVSA A MAALFS ₄₂₋₅₆	42	18
NG D GG I LIG N GGAG ₁₃₁₋₁₄₅	131	18
LIG D GG D GGAG G NGT ₄₃₂₋₄₄₆	432	14
VAT D LAG I G S TIGTA ₁₄₋₂₈	14	12

El núcleo peptídico de cada péptido se resalta en negritas

Con base en lo anterior, el péptido 1 (DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁) presenta la mayor probabilidad de unión. De igual forma, los cuatro péptidos restantes también tienen la probabilidad de ser reconocidos y presentados por la molécula I-A^k debido a que poseen ácido aspártico (Asp) en la primera posición de su núcleo peptídico, el cual es el requerimiento más influyente para la interacción con I-A^k (Nelson et al., 1996).

Otros estudios también han aplicado inmunoinformática para predecir péptidos inmunogénicos de PE_PGRS33. En 2005, Chaitra y colaboradores (Chaitra et al., 2005b) emplearon el algoritmo de predicción HLA-BIND para identificar dos péptidos (ALGGGATGV₃₈₅₋₃₉₃ y TIPEALAAV₆₋₁₄) restringidos a la molécula del MHC-I HLA-A*0201; los péptidos mostraron alta afinidad hacia esta molécula, tal como lo revelaron ensayos de modelado molecular. En un estudio subsecuente, los dos péptidos se utilizaron para estimular PBMC de sujetos aparentemente sanos y de pacientes con TB e indujeron una respuesta inmune, en la forma de proliferación celular y secreción de IFN- γ por células T CD8⁺, en ambos grupos de estudio (Chaitra et al., 2008).

Los estudios anteriores nos muestran que la inmunoinformática es una técnica útil y práctica para identificar péptidos inmunodominantes de la proteína PE_PGRS33, con el potencial de ser utilizados en el desarrollo de nuevas vacunas contra la TB. La identificación de estos péptidos inmunodominantes de células T también permitirá el estudio de una respuesta inmune específica hacia PE_PGRS33. Además, el uso de vacunas a base de péptidos resulta útil al permitir guiar la respuesta inmune sólo hacia aquellos péptidos que son mayormente presentados a las células T. En el presente estudio, la predicción fue dirigida hacia una molécula del MHC-II, por lo tanto, los péptidos inmunodominantes de células T de PE_PGRS33 identificados tienen el potencial de activar una respuesta inmune a cargo de los linfocitos CD4⁺, la cual es muy importante en el control de la infección por *Mtb* (Robinson et al., 2015).

Interacciones Moleculares de los Péptidos Inmunodominantes de PE_PGRS33 con la Molécula I-A^k

La técnica de modelados de homología se desarrolló con el objetivo de crear modelos tridimensionales de una proteína a partir de su secuencia aminoacídica, basado en el alineamiento con la secuencia aminoacídica de una proteína similar de estructura conocida (Bordoli et al., 2009). Esta técnica es considerada el método computacional más exacto para predecir estructuras tridimensionales de proteínas, en un menor tiempo y costo (Muhammed & Aki-Yalcin, 2018).

Una vez identificados los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33, se llevó a cabo la construcción de modelados de homología para cada uno de ellos. Debido a que el péptido DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ presentó el mayor puntaje de unión (Tabla III), sólo se presenta el modelado de este. En la figura 7 se aprecia, de manera general, el acomodo del péptido DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ en la hendidura de unión de la molécula I-A^k.

En tanto, en la figura 8, se muestra como ciertos aminoácidos de DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ interaccionan con I-A^k. El análisis se centró en los aminoácidos de las posiciones 1, 4, 6 y 9 del núcleo peptídico, al ser estos claves para la unión con I-A^k. Estos aminoácidos interaccionan con la hendidura de unión de I-A^k en los bolsillos 1, 4, 6 y 9 de la molécula. Se puede observar que DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ posee Asp para interactuar con el bolsillo 1, justo como DYGILQINS₅₂₋₆₀ (péptido modelo) (Figura 8).

Respecto al bolsillo 4, DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ presenta asparagina (Asn) mientras que DYGILQINS₅₂₋₆₀ tiene isoleucina (Ile) (Figura 8), esta discrepancia podría no afectar la interacción entre DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ e I-A^k, de acuerdo con datos que mencionan la presencia de Asn en otros péptidos acoplados con I-A^k (Fremont et al., 1998).

El bolsillo 6 representa el segundo sitio más restrictivo, interactúa preferentemente con los aminoácidos glutamina (Gln) y ácido glutámico (Glu). DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ contiene prolina (Pro) en la posición 6 en lugar de Glu como DYGILQINS₅₂₋₆₀ (Figura 8), esto puede afectar la manera en la que DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ se acopla con I-A^k, ya que

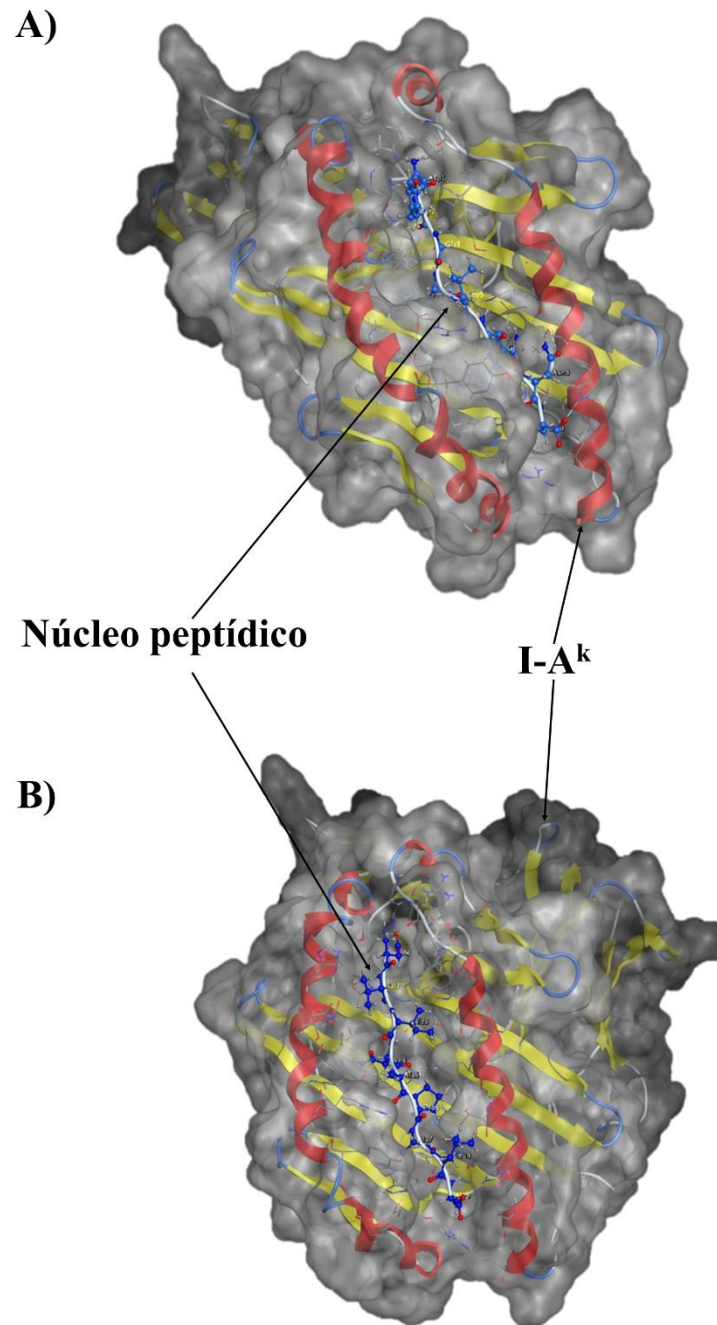


Figura 7. Modelos de homología de péptidos de células T. A) Modelo de péptido DYGILQINS₅₂₋₆₀. B) Modelo de péptido DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁.

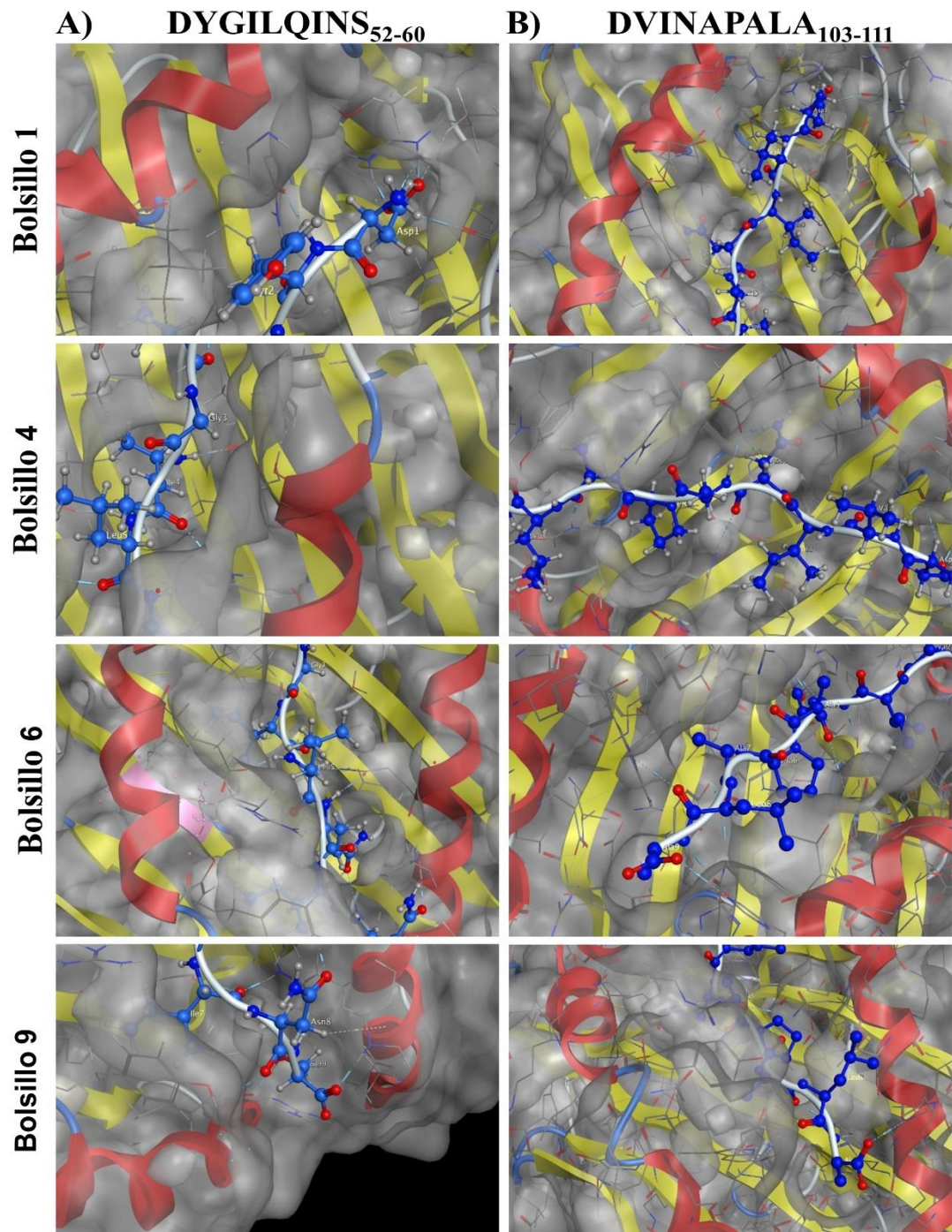


Figura 8. Comparación de interacciones entre péptidos y los bolsillos de la molécula I-A^k. A) Péptido modelo. B) Péptido inmunogénico de PE_PGRS33.

Pro difiere en tamaño y carga respecto a Glu, causando además que Pro no sea capaz de formar puentes de hidrógeno con I-A^k, promoviendo una interacción menos estable entre Pro y el bolsillo 6.

Está descrito que el bolsillo 9 acepta tanto aminoácidos de pequeño como de grande tamaño. DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ contiene alanina (Ala) en comparación con serina (Ser) para DYGILQINS₅₂₋₆₀ (Figura 8). Esto no representa problema alguno al ser ambos aminoácidos similares en tamaño y capaz de formar interacciones de hidrógeno con el bolsillo 9.

Las interacciones específicas de DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ con los aminoácidos de los cuatro bolsillos de I-A^k se muestran en la tabla IV.

La técnica de modelados de homología nos permite observar interacciones proteína-proteína con una precisión cercana a la de una estructura de cristografía de baja resolución. Esta técnica se vuelve muy útil para estudiar el cómo la estructura de una proteína puede mejorar o empeorar su acoplamiento con otra proteína. Hasta ahora, no hay datos reportados acerca del uso de los modelados de homología en investigación en TB; sin embargo, se han empleado otras técnicas que hacen uso de modelos tridimensionales. Para PE_PGRS33, se reportó el uso de modelos tridimensionales para analizar la interacción de péptidos de células T con 33 alelos HLA de clase I (Chaitra et al., 2005a).

Otros antígenos micobacterianos también han sido estudiados con modelos tridimensionales, como ejemplo se encuentra un complejo peptídico de los antígenos ESAT6 y CFP-10; este modelo tridimensional permitió conocer la interacción entre el complejo y el receptor TLR4/MD2 (Rana & Akhter, 2016).

Los modelos tridimensionales han sido aplicados también para el estudio de otros patógenos. Para *Vibrio cholerae*, la construcción de un modelo tridimensional ha permitido evaluar como una vacuna, hecha a partir de un conjunto de cinco antígenos protectores, interactúa con el receptor TLR2 (Nezafat et al., 2016).

Tabla IV. Interacciones moleculares del péptido DVINAPALA₁₀₃₋₁₁₁ con I-A^k.

Bolsillo	Aminoácidos de DYGILQINS ₅₂₋₆₀	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k	Aminoácidos de DVINAPALA ₁₀₃₋₁₁₁	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k
1	Asp	Arg 79, Arg 80	Asp	Arg 79, Arg 80
4	Ile	Tyr 35, Asn 89	Asn	Tyr 35, Glu 99, Asn 89
6	Gln	Asn 89, Asn 96, His 36	Pro	Phe 38
9	Ser	Asn 96, His 95, Asp 84, Arg 103	Ala	Asn 96, His 95

A través de la inmunoinformática, se logró igualmente la construcción de una vacuna de péptidos de células T de cinco proteínas de *Brucella melitensis* y *Brucella abortus*; asimismo, se determinaron las características físico-químicas y la estructura terciaria del constructo mediante un modelo tridimensional (Saadi et al., 2017).

En el presente estudio, los modelados de homología permitieron analizar como los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33 se acoplan a una molécula del MHC-II. Esto podría ser de utilidad para modificar la estructura de nuestros péptidos para mejorar su afinidad por moléculas del MHC, lo cual puede traducirse en una mayor inmunogenicidad.

Homología de la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes con el Proteoma Humano

La función primaria del sistema inmunológico es la de brindar protección en contra de agentes patógenos. Una vez que el agente patógeno ingresa al organismo, este es reconocido por los componentes del sistema inmune provocando el desarrollo de una respuesta inmunitaria destinada a eliminar al agente infeccioso. En este contexto, el sistema inmune ha desarrollado la habilidad de distinguir antígenos propios de los no propios. Esta particularidad se rige por mecanismos de tolerancia central y periférica dedicados a evitar y/o suprimir la generación de respuestas inmunes contra antígenos propios, conocidas como respuestas autoinmunes. Los mecanismos de tolerancia inmunológica pueden verse afectados por ciertos factores como lo es el mimetismo molecular. Este fenómeno radica en la presencia de homología entre los antígenos de un microorganismo y los del propio individuo, de tal modo que, durante el proceso de infección, el sistema inmunológico pudiera reaccionar hacia antígenos propios contribuyendo a la generación de respuesta autoinmune (Rojas et al., 2018).

Con el objetivo de identificar la presencia de homología entre PE_PGRS33, y sus péptidos con proteínas humanas, se realizó un análisis tipo BLAST. Los resultados mostraron una baja homología (34%) de PE_PGRS33 con proteínas de colágeno.

En la tabla V se aprecia que, si bien los péptidos muestran porcentajes de identidad del 100%, la cobertura en la secuencia de aminoácidos está por debajo del 50% en la mayoría de los péptidos; esto significa, de acuerdo a reportes de otros grupos de investigación, que nuestros péptidos presentan baja homología con el proteoma humano (Shah et al., 2018).

El hecho de que PE_PGRS33 y sus péptidos presenten baja homología con proteínas humanas representa poca probabilidad de que estos antígenos generen respuestas de tipo autoinmune. Estas respuestas se desarrollan a causa de un alto grado de similitud entre la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés y proteínas humanas, lo cual deriva en la unión estable de un complejo péptido propio-MHC y, como consecuencia, la activación cruzada de respuestas autoinmunes (Jaravine et al., 2017).

Potencial Alergénico de la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I o de reacción inmediata son aquellas mediadas por mecanismos activados por la inmunoglobulina IgE, caracterizadas por síntomas desde leves a potencialmente fatales, constituyendo el cuadro clínico de las alergias. Estas respuestas son desencadenadas por el reconocimiento de antígenos llamados alérgenos.

La sensibilización a los alérgenos se presenta cuando células Th2 promueven el cambio de isotipo en células B para producir anticuerpos IgE (Dispenza, 2019). Gran parte de estos anticuerpos permanece unida al receptor de alta afinidad FcεRI en la superficie de basófilos y mastocitos. En un segundo encuentro con el alérgeno se promueve el entrecruzamiento de este con la IgE específica sobre estas células, guiando a la liberación de mediadores químicos en dos fases. La fase temprana ocurre dentro de minutos y es mediada por la liberación de histamina, proteasas y enzimas lisosomales que son liberadas de forma inmediata a causa de la degranulación de basófilos y mastocitos (Dispenza, 2019).

Tabla V. Homología de los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33 con el proteoma humano.

Péptido	Identidad (%)	Cobertura de la secuencia (%)	Proteína	No. de acceso de la proteína
GVLVDVINAPALALLG ₁₀₀₋₁₁₄	100	46	Proteína sin nombre	BAG61252.1
AAADEVSAAMAALFS ₄₂₋₅₆	100	40	Proteína dedo de zinc 34, isoforma 3	NP_001273699.1
NGGDGGILIGNGGAG ₁₃₁₋₁₄₅	100	46	Espermina sintasa, isoforma CRA_b	EAW98985.1
LIGDGGDGGAGGNGT ₄₃₂₋₄₄₆	100	53	Proteína hipotética	CAB70896.1
VATDLAGIGSTIGTA ₁₄₋₂₈	100	40	Región de unión de la cadena pesada de inmunoglobulina	MBB2009779.1

En la columna 5 se muestra el número de acceso (Genbank, NCBI) de la proteína humana con mayor homología a cada uno de los péptidos.

La fase tardía se presenta cuatro u ocho horas después de la exposición al alérgeno, en la cual se liberan citocinas como IL-1, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13 y GM-CSF (Dispenza, 2019). Los síntomas presentados dependerán de la ruta de exposición del alérgeno.

Todo tipo de moléculas pueden constituir un potencial alérgeno, desde proteínas hasta moléculas pequeñas como los fármacos. Por esta razón, se analizó el potencial alérgico de PE_PGRS33 y sus péptidos, utilizando la herramienta híbrida del servidor AlgPred. Los resultados mostraron que PE_PGRS33 y los péptidos no poseen potencial alérgico, demostrando la baja probabilidad de que estos antígenos activen una respuesta de hipersensibilidad inmediata.

Perfil de Unión a Alelos HLA de Clase II y Análisis de Cobertura Poblacional de los Péptidos Inmunodominantes de la Proteína PE_PGRS33

La respuesta inmune adaptativa, a cargo de las células T CD4⁺, resulta esencial para el adecuado control de la infección por *Mtb*. En este punto se vuelve necesario encontrar antígenos con la facultad de activar una respuesta por parte de las células T CD4⁺. La activación de estas células depende de su capacidad de reconocer péptidos acoplados a moléculas del MHC II, a través de la vía de procesamiento y presentación del antígeno de clase II. Por lo tanto, utilizando los recursos de la IEDB, llevamos a cabo un análisis inmunoinformático para determinar la capacidad de unión de los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33 con alelos HLA de clase II. El análisis se realizó utilizando los 26 alelos de clase II expresados con mayor frecuencia a nivel mundial (Greenbaum et al., 2011).

El análisis de IEDB mostró que tres de los cinco péptidos inmunodominantes son capaces de unirse a algunos de los alelos de HLA de clase II (Tabla VI). Estos datos nos hablan de la alta probabilidad de ser reconocidos por células T CD4⁺ y en consecuencia generar la correspondiente respuesta inmune. En relación a este punto, un estudio previo ha demostrado que existe restricción en la respuesta de las células T hacia TB, asociada principalmente con polimorfismos del alelo HLA-DRB (Ottenhoff et al., 1985).

En dicho estudio se observó que la respuesta proliferativa de células T de 102 individuos, estimuladas con PPD, estuvo restringida hacia alelos HLA-DR y no HLA-DP o HLA-DQ. Como podemos ver en la tabla VI, el péptido GVLVDVINAPALALLG₁₀₀₋₁₁₄ presenta reactividad con cuatro alelos HLA-DR, lo que lo posiciona como un buen candidato para inducir la activación de células T.

Basados en los resultados mostrados en la tabla VI se procedió a realizar un análisis de cobertura poblacional de los péptidos inmunodominantes. Se encontró que los péptidos presentan una cobertura poblacional arriba del 70% en al menos cuatro de las siete regiones del mundo con mayor prevalencia de TB (Tabla VII).

Los datos de cobertura poblacional representan la fracción de individuos que pueden potencialmente responder a un determinado péptido, basado en las frecuencias genotípicas de los alelos HLA y datos de unión al MHC. Por consiguiente, esta información es útil para tener una idea relativa del alcance y posible efectividad de una vacuna a base de péptidos de la proteína PE_PGRS33.

Establecimiento de un Modelo Humano de Infección *in vitro*

Hoy en día la vacuna BCG es la única autorizada para su uso contra la TB. No obstante, no ha probado ser muy eficaz para brindar protección contra el desarrollo de TB pulmonar en adultos. En consecuencia, grupos de investigación alrededor del mundo se han dedicado a realizar estudios que coadyuven al desarrollo de una vacuna con mayor eficacia protectora que la BCG.

Estos estudios comienzan con la caracterización de la respuesta inmune de antígenos micobacterianos para lo cual el uso de modelos de experimentación, tanto *in vivo* como *in vitro*, constituye la piedra angular de este proceso. Por años, el modelo murino ha sido el más ampliamente utilizado para el estudio de la inmunología de la TB (Tezera et al., 2017). Sin embargo, el ratón no es el hospedero natural de *Mtb* por lo que la respuesta inmune que desarrolla durante la infección difiere de aquella presentada en humanos, la cual resulta ser muy compleja.

Tabla VI. Perfil de unión a HLA de clase II de los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33

Péptido	Alelos HLA de clase II
GVLDVINAPALALLG ₁₀₀₋₁₁₄	HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB1*01:01, HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01, HLA-DRB1*12:01
AAADEVSAAMAALFS ₄₂₋₅₆	HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02, HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02, HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02
VATDLAGIGSTIGTA ₁₄₋₂₈	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01
NGGDGGILIGNGGAG ₁₃₁₋₁₄₅	*
LIGDGGDGGAGGNGT ₄₃₂₋₄₄₆	*

HLA, antígenos leucocitarios humanos. *Rango percentil ≥ 5

Tabla VII. Cobertura poblacional de los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33

Péptido	Cobertura poblacional (%)							
	Mundial	India	China	Indonesia	Pakistán	Nigeria	Sudáfrica	Filipinas
GVLVDVINAPALALLG ₁₀₀₋₁₁₄	77.14	73.15	71.61	61	24.96	55.73	5.91	1.22
AAADEVSAAMAALFS ₄₂₋₅₆	91.35	77.21	93.83	73.95	42.54	0	0	0
VATDLAGIGSTIGTA ₁₄₋₂₈	56.45	45.08	58.59	55.72	23.56	0	0	0

Este último punto origina la necesidad de encontrar modelos de estudio capaces de mimetizar de forma más cercana la respuesta inmune en la TB humana.

Una posible solución a este problema lo constituye el desarrollo de modelos *in vitro* que se apoyen del uso de células humanas, tales como las células mononucleares de sangre periférica. Estas células representan la fuente de las principales células de la respuesta inmune contra *Mtb*, al contener monocitos capaces de diferenciarse a macrófagos, así como linfocitos, tanto B como T.

En consecuencia, se llevó a cabo el establecimiento de un modelo humano de infección *in vitro* para el estudio de la respuesta inmune hacia la proteína PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes. El modelo se elaboró utilizando células mononucleares de sangre periférica de individuos aparentemente sanos, BCG vacunados y, como agente infeccioso, se empleó *M. bovis* BCG.

Primero se determinó la dosis de bacteria más adecuada para la infección. Para esto se evaluaron distintas MOI (multiplicidad de la infección): 25, 5, 2.5 y 1, y se realizaron observaciones mediante microscopía óptica cada 24 h. En el día nueve del ensayo se observaron agregados celulares que dieron indicios de la presencia de muerte celular en el cultivo en todas las dosis de infección (Figura 9A). Acorde con resultados similares de otros grupos de investigación (Garza-Cuartero et al., 2015), esto se encuentra asociado al empleo de dosis altas de infección. Además, en las condiciones donde se emplearon MOI de 25, 5 y 2.5 (Figura 9A), se visualizó la formación de estructuras tipo “cordón” en la periferia de los agregados celulares. Dichas estructuras también se observaron con la MOI más baja de 1 en el día 13 del ensayo (Figura 9B). La formación de estas estructuras está asociada al escape de la bacteria del interior de la célula hacia el exterior, lo que implicaría la muerte de las células infectadas y explica la disminución observada en la viabilidad celular (Figura 10).

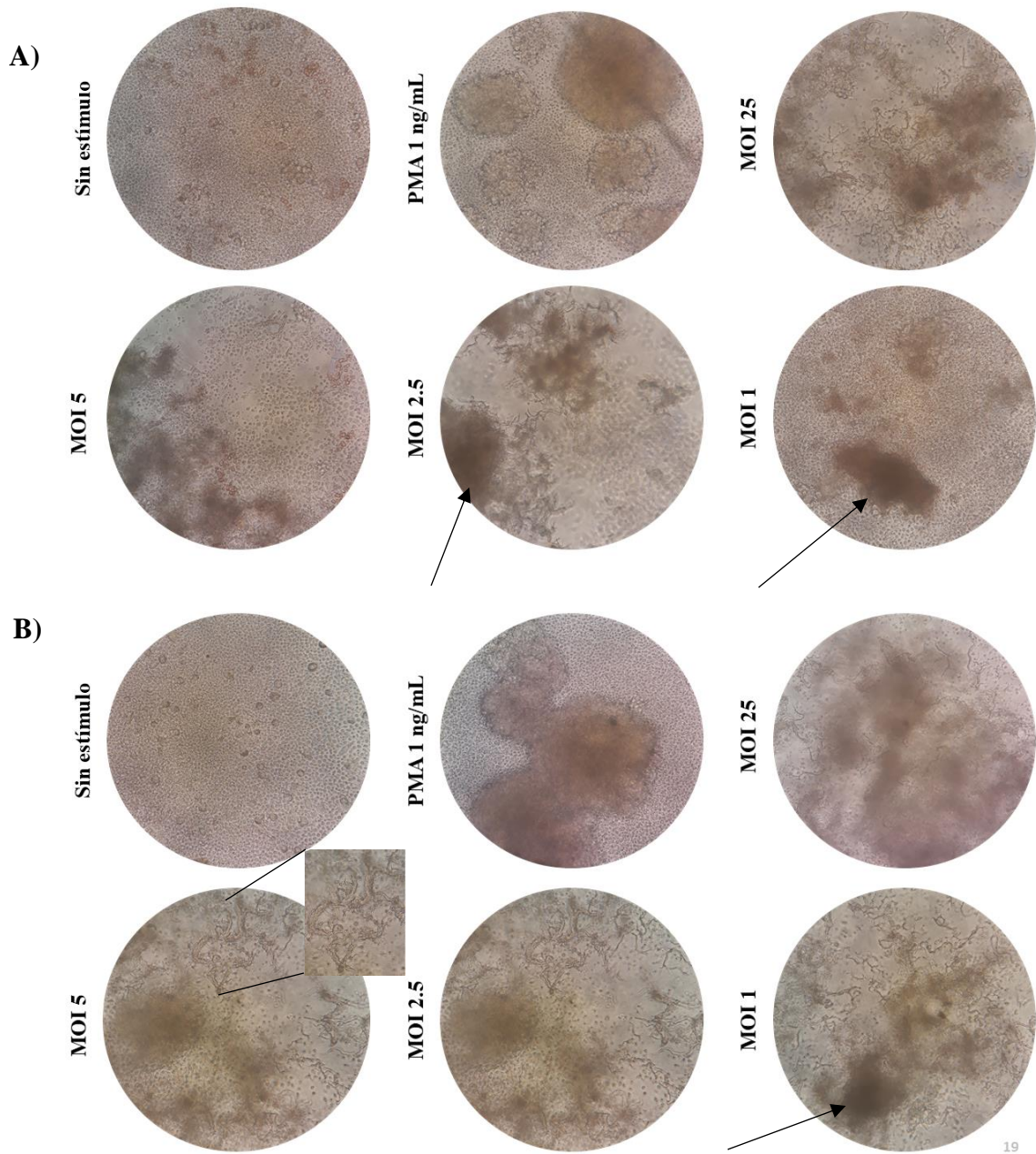


Figura 9. Modelo humano de infección *in vitro* con *M. bovis* BCG. A) Día 9 donde se observa la presencia de muerte celular (flechas negras), así como la formación de cordones bacterianos en la MOI de 25, 5 y 2.5. B) Día 13 del ensayo donde se observa la presencia de cordones bacterianos en todas las dosis de infección, indicando la liberación de bacteria al medio extracelular. PMA, forbol miristato acetato. MOI, multiplicidad de la infección.

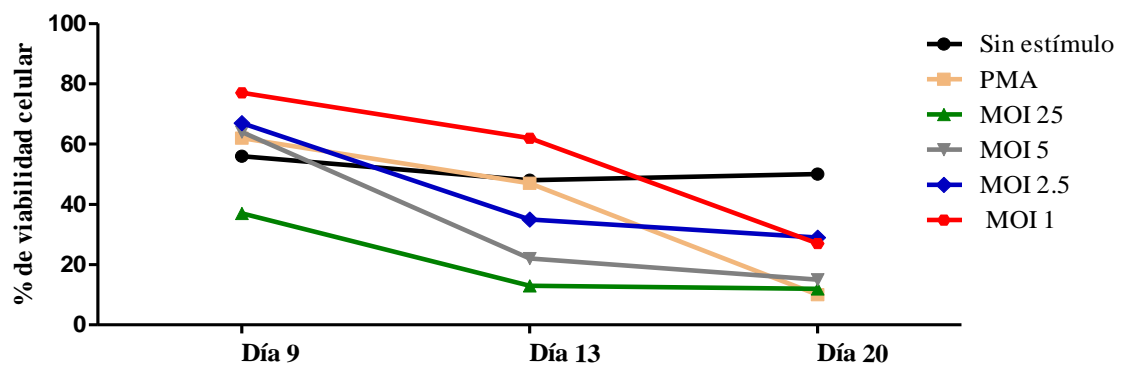


Figura 10. La infección con *M. bovis* BCG induce muerte celular. Basado en los resultados de la figura 10, se llevó a cabo una cuenta con azul de tripano y se confirmó la presencia de muerte celular en el cultivo. PMA, forbol miristato acetato. MOI, multiplicidad de la infección.

Para corroborar el escape de la bacteria hacia el medio extracelular se utilizó de manera representativa la condición de infección con MOI de 25 del día 20 del ensayo, y se ejecutó un conteo de UFC (unidades formadoras de colonia) tanto del sobrenadante de cultivo como de las mismas células infectadas, encontrando aproximadamente 10 veces más la cantidad de UFC en el sobrenadante respecto a las células infectadas (Figura 11). Cabe destacar, que al día 20 del ensayo, la presencia de los cordones bacterianos era aún más notoria (Anexo 3).

Los resultados indican una falta de control del crecimiento bacteriano por parte de los componentes celulares del sistema, en especial de los monocitos. Esto puede asociarse al hecho de que los monocitos al momento de ser infectados se encontraban en un estado de no activación, trayendo como consecuencia una menor capacidad de controlar posibles agentes infecciosos, en este caso a *M. bovis* BCG.

Una vez activados con el estímulo adecuado, los monocitos pueden aumentar su capacidad de secretar citocinas de tipo inflamatorio como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, además de aumentar en membrana la expresión de marcadores de activación como CD-80, CD86 y moléculas del MHC de clase II (Boyette et al., 2017). Estas propiedades, en combinación con la interacción con otras células, como linfocitos T, podrían ayudar a los monocitos a controlar más eficientemente un proceso de infección. Por lo tanto, una alternativa sería estimular a los monocitos para inducir un estado de preactivación y contribuir a que estos puedan controlar mejor el reto infeccioso.

Para inducir un estado de preactivación en los monocitos se procedió a estimular con IFN- γ . Esta citocina es reconocida por su capacidad de generar y coordinar un variado número de funciones antimicrobianas. Esta proteína es capaz de amplificar el procesamiento y presentación del antígeno al inducir un aumento en la expresión de moléculas del MHC sobre las células presentadoras de antígeno (Kak et al., 2018). Además, es capaz de promover la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Kak et al., 2018). Por estos y demás atributos, el IFN- γ es una opción viable para usarlo como un agente activador.

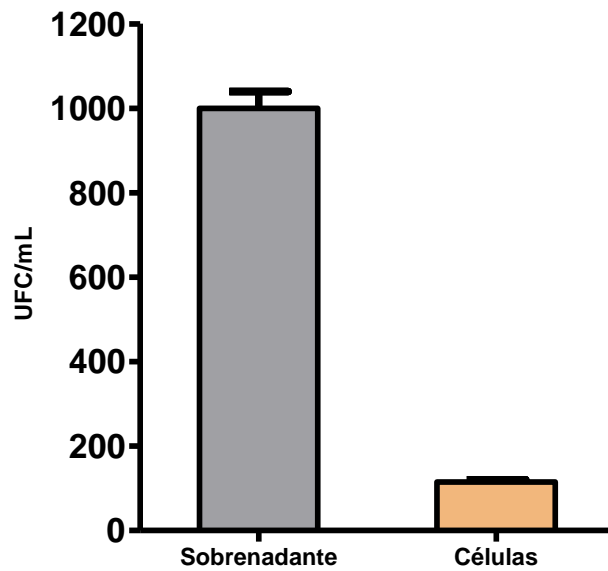


Figura 11. *M. bovis* BCG escapa al medio extracelular durante un ensayo de infección *in vitro*. Al día 20 del ensayo se ejecutó un conteo de UFC observando aproximadamente 10 veces más cantidad de bacteria en el medio extracelular respecto al interior de las células infectadas. UFC, unidad formadora de colonias.

En primer lugar, se procedió a evaluar el efecto de distintas dosis de IFN- γ sobre los monocitos humanos. El efecto se analizó a través de la producción de TNF- α como señal de activación por parte de los monocitos. Los resultados encontrados mediante el ensayo de ELISA demuestran que todas las dosis evaluadas de IFN- γ lograron inducir un estado de activación (Figura 12).

Una vez que se evaluó la capacidad del IFN- γ de activar a los monocitos, se seleccionaron las concentraciones más bajas y se procedió a realizar un ensayo de infección con *M. bovis* BCG. En este ensayo se evaluaron distintas dosis de infección en conjunto con diferentes concentraciones de IFN- γ , utilizadas para estimular a los monocitos previo a la infección (Figura 13).

El ensayo de infección se incubó durante seis días con el objetivo de recolectar el sobrenadante y buscar la presencia de IFN- γ , con la finalidad de detectar en cual o cuales condiciones el sistema de infección mostraba una señal de activación que probara la interacción de los componentes celulares del sistema: monocitos/*M. bovis* BCG/linfocitos.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA señalan que cinco de las 16 condiciones evaluadas mostraron activación (Figura 14). Estas condiciones fueron aquellas donde se estimuló a los monocitos con 5 ng/mL de IFN- γ y se infectaron con una MOI 10, donde se estimularon con 2.5 ng/mL de IFN- γ e infectaron con MOI 5, en dos donde se infectó a una MOI 2.5 y se estimuló a los monocitos con 5 y 2.5 ng/mL de IFN- γ , y finalmente, al estimular con 5 ng/mL de IFN- γ e infectar con una MOI 1 (Figura 14).

En las condiciones en las cuales se infectó sin estimular previamente a los monocitos con IFN- γ no fue posible detectar la presencia de dicha citocina, al menos no en concentraciones por arriba de los controles negativos. Esto es de esperarse, puesto que en resultados mostrados previamente se observó que al infectar sin preactivar a los monocitos, el sistema era incapaz de controlar de forma adecuada la infección, encontrando la presencia de cordones bacterianos y una disminución en la viabilidad celular (Figuras 9 y 10).

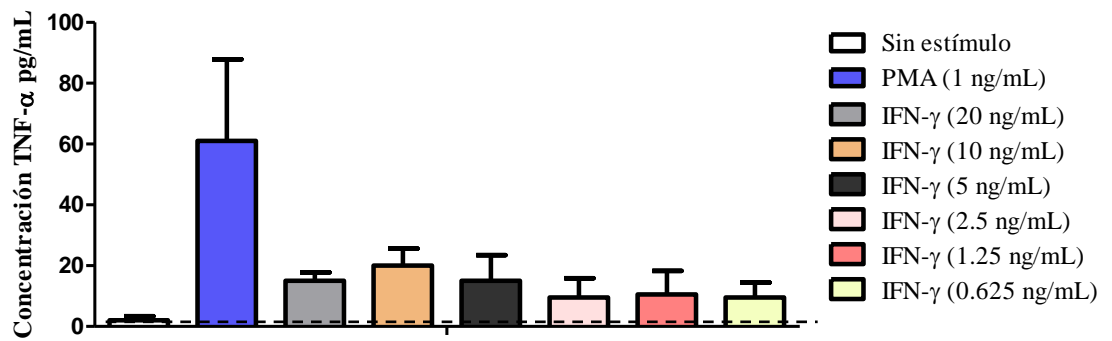


Figura 12. IFN- γ induce la producción de TNF- α en monocitos humanos. Se aislaron monocitos de sangre periférica y se estimularon con distintas dosis de IFN- γ . Es posible apreciar que todas las dosis lograron activar a los monocitos, reflejándose a través de la producción de TNF- α . IFN- γ , interferón gamma. PMA, forbol miristato acetato. TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa.

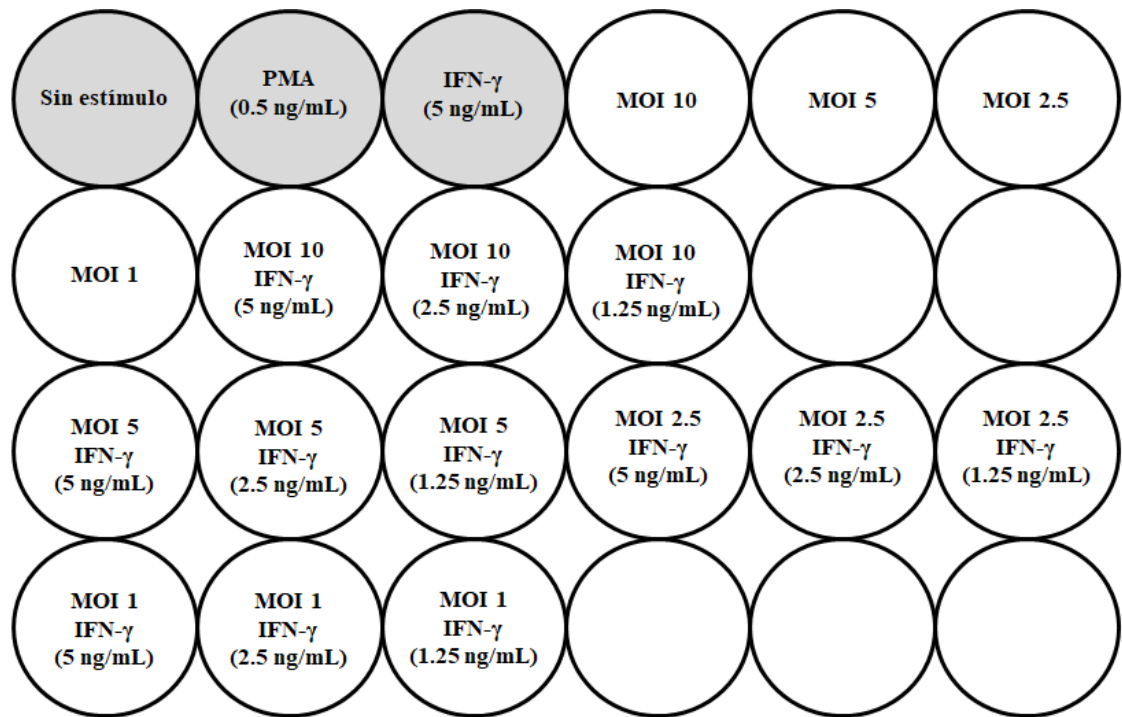


Figura 13. Esquema de condiciones para el ensayo de infección *in vitro* con *M. bovis* BCG. Previo a la infección con la bacteria, se estimuló a los monocitos con diferentes concentraciones de IFN- γ por 48 h. El estímulo se retiró y se infectó con *M. bovis* BCG con distintas MOI por 4 h. Posteriormente, se retiró la bacteria remanente mediante lavados y se añadieron los linfocitos a cada pozo. En color gris se resaltan los pozos que forman los controles del ensayo experimental, el resto de los pozos representan las variables evaluadas. IFN- γ , interferón gamma. MOI, multiplicidad de la infección. PMA, forbol miristato acetato.

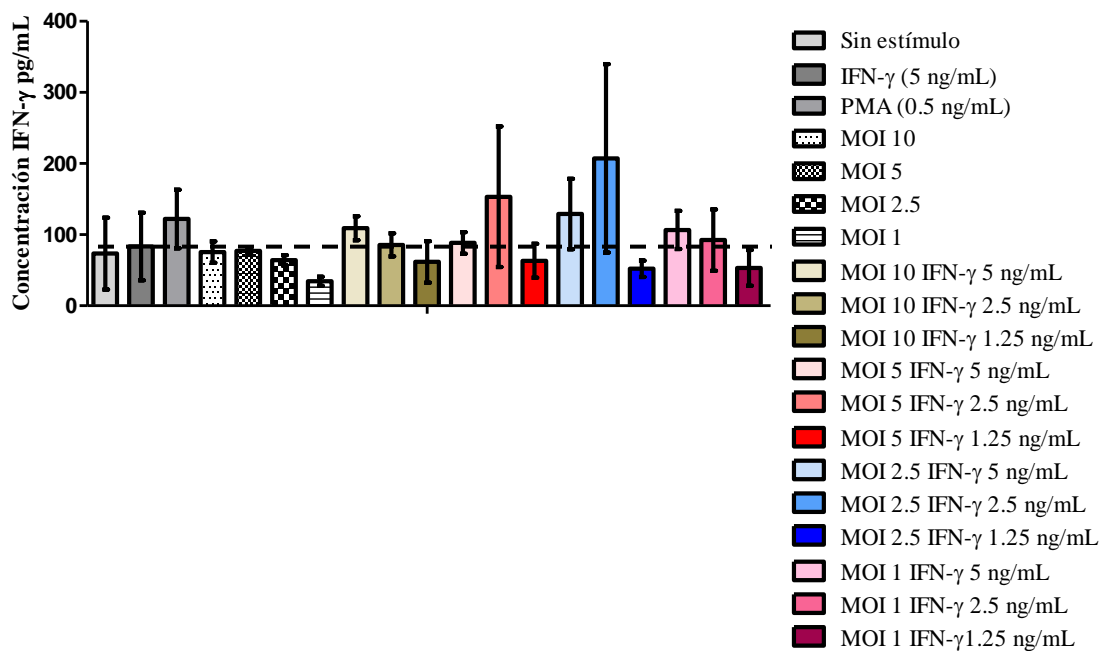


Figura 14. Evaluación de la producción de IFN- γ en un sistema humano de infección *in vitro*. Para desarrollar el sistema, los monocitos se infectaron a distintas MOI con *M. bovis* BCG, previa estimulación con diferentes dosis de IFN- γ . Al finalizar se agregaron linfocitos al sistema. Se realizó análisis estadístico con la prueba U de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Se eligió la mejor condición con base en la concentración de IFN- γ . IFN- γ , interferón gamma. MOI, multiplicidad de la infección. PMA, forbol miristato acetato.

La activación pudo detectarse sólo en aquellas condiciones donde se preactivó a los monocitos con IFN- γ , probablemente debido a que esta citocina logró amplificar funciones en los monocitos como la creación de especies reactivas del oxígeno o nitrógeno, mejor formación y acidificación de fagolisosomas que en conjunto permitieron un mejor control del crecimiento bacteriano dentro del monocito. Además, el IFN- γ es conocido por inducir un aumento en la expresión de moléculas del MHC lo cual pudo haber hecho más eficiente la presentación de antígenos derivados de *M. bovis* BCG a los linfocitos T presentes en el cultivo, promoviendo así una mejor activación de estas células con la consecuente producción de IFN- γ . La condición con una estimulación de los monocitos con 2.5 ng/mL de IFN- γ e infección con MOI de 2.5 demuestra ser la ideal de todas las evaluadas, esto en términos de la concentración de IFN- γ detectada en el sobrenadante.

Por lo tanto, esta condición se utilizó en ensayos posteriores para analizar la respuesta inmune hacia la proteína PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes.

Evaluación de la Activación de Monocitos Humanos Inducida por la Proteína PE_PGRS33 y sus Péptidos Inmunodominantes

En la actualidad aún no se cuenta con una vacuna que supere la eficacia protectora proporcionada por la BCG. Esto lleva a la necesidad de seguir caracterizando antígenos de *Mtb* que estimulen una respuesta inmune capaz de brindar protección en contra de la infección por el bacilo tuberculoso.

Ya se han mencionado previamente las propiedades inmunogénicas de la proteína PE_PGRS33, por las cuales resulta un candidato atractivo para la búsqueda de nuevos antígenos contra *Mtb*; entre estas, su capacidad de inducir respuestas tanto celular como humoral en modelos murinos, así como el ser reconocida durante la infección natural por *Mtb* y promover la producción de anticuerpos con propiedades neutralizantes. Sin embargo, poco es conocido acerca de la respuesta inmune hacia componentes peptídicos derivados de PE_PGRS33. Los péptidos resultan moléculas atractivas en vacunología puesto que permiten dirigir la respuesta inmune sólo hacia los componentes del antígeno

encargados de inducir una respuesta inmune adaptativa. Además, poseen características como buena estabilidad química, fácil producción, así como menor riesgo de reacciones tóxicas en comparación con el uso del antígeno completo o del patógeno atenuado (Patronov & Doytchinova, 2013).

Tomando en cuenta lo anterior, se propuso estudiar la respuesta inmune hacia los péptidos inmunodominantes de PE_PGRS33. Se seleccionaron tres péptidos de esta proteína con base en el análisis inmunoinformático presentado con anterioridad, así como en previos resultados del grupo de investigación. Estos péptidos se obtuvieron de manera comercial a través de la compañía GenScript (Figura 15).

Después de obtener los péptidos, se procedió a evaluar la respuesta inmune hacia los mismos empleando monocitos humanos. La evaluación consistió en estimular las células con PE_PGRS33 y los péptidos, y analizar la producción de TNF- α por los monocitos. Se aislaron monocitos de la sangre periférica de cuatro sujetos masculinos, aparentemente sanos, BCG vacunados.

Los resultados de la prueba de ELISA mostraron que los monocitos de todos los sujetos se activaron en presencia de PE_PGRS33, con la subsecuente producción de TNF- α (Figura 16). En cuanto a los péptidos, sólo uno de los cuatro sujetos mostró activación en respuesta a la estimulación con los tres péptidos y a la acción combinada de los mismos, resaltando que la activación se observó en las condiciones donde los monocitos fueron estimulados previamente 24 h con IFN- γ , y 24 h adicionales con los péptidos, solos y en combinación (Figura 16).

En relación al efecto de activación inducido por PE_PGRS33, este concuerda con otras investigaciones que han reportado la capacidad de esta proteína de inducir la producción de TNF- α en macrófagos, a través de la interacción de su dominio PGRS con el receptor TLR-2 (Basu et al., 2007; Zumbo et al., 2013). Además, la respuesta de TNF- α fue mayor cuando los monocitos fueron previamente estimulados con IFN- γ , muy probablemente debido al aumento en la capacidad de los monocitos activados de secretar mayor cantidad de citocinas.

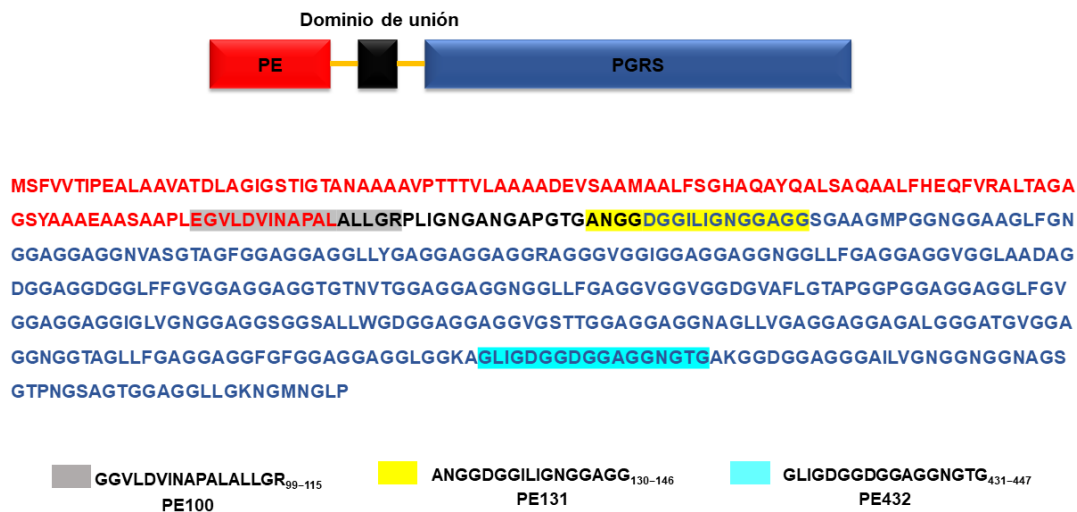


Figura 15. Secuencia de aminoácidos de los péptidos inmunodominantes de la proteína PE_PGRS33. Se presenta la secuencia aminoacídica de PE_PGRS33 resaltando en rojo el dominio PE y en azul el dominio PGRS. Dentro de la secuencia de PE_PGRS33 se resalta la propia secuencia aminoacídica de cada péptido. A cada péptido se le asignó un nombre clave. En color gris es señalada la secuencia de aminoácidos del péptido PE100, en amarillo la de PE131 y en turquesa la correspondiente a PE432.

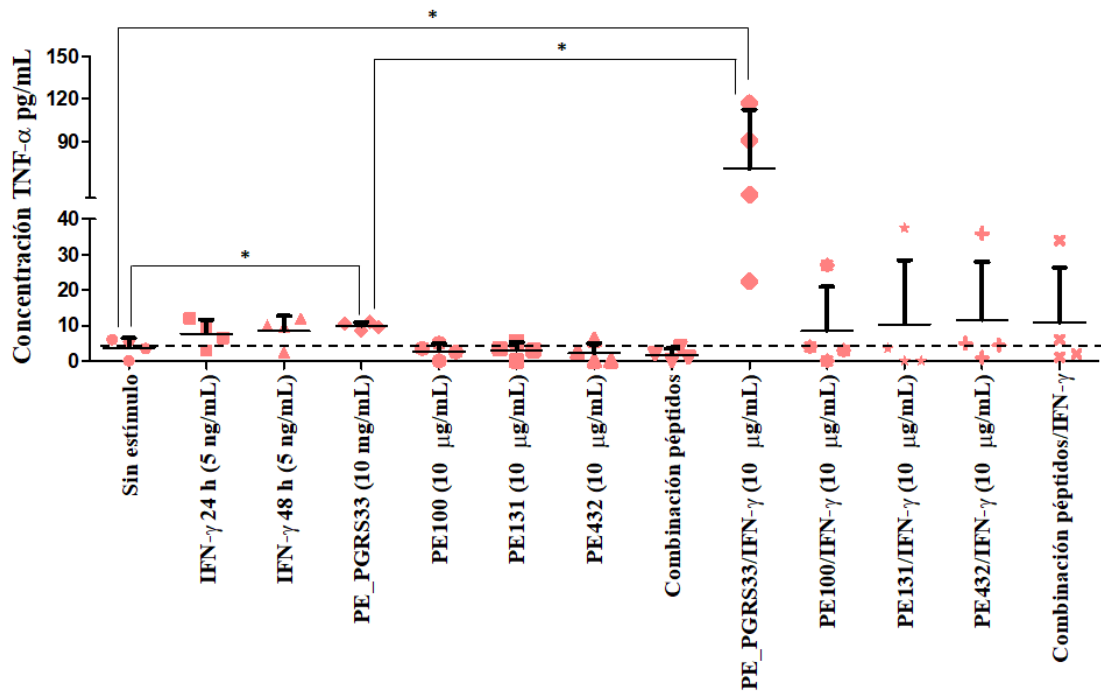


Figura 16. La proteína PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes inducen la producción de TNF- α en monocitos humanos. Se aislaron monocitos de sujetos masculinos, aparentemente sanos, BCG vacunados. Las células fueron estimuladas con la proteína PE_PGRS33 y sus péptidos, solos o en combinación por 48 h. En un segundo conjunto de condiciones los monocitos fueron estimulados previamente con 5 ng/mL de IFN- γ por 24 h, el estímulo se retiró y se procedió a estimular con PE_PGRS33 y los péptidos, solos o en combinación por 24 h adicionales. En todas las condiciones tanto la proteína como sus péptidos se utilizaron a concentración de 10 μ g/mL. IFN- γ , interferón gamma. TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa. *Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), prueba U de Mann-Whitney.

Los péptidos de PE_PGRS33 lograron inducir la activación de los monocitos en uno de los cuatro sujetos de estudio. La activación se observó en las condiciones donde se preactivó a los monocitos con IFN- γ (Figura 16). En este caso es probable que los péptidos no sean capaces de activar a los monocitos por su cuenta cuando estas células se encuentran en estado de reposo.

La proteína PE_PGRS33 promovió la activación de los monocitos sin necesidad de estimular de manera previa, debido probablemente a que al estar presente su secuencia completa de aminoácidos proporciona un número variado de determinadas secuencias capaces de interactuar con distintos receptores celulares, promoviendo un mayor entrecruzamiento de receptores y una activación más eficiente de la célula.

Una característica a resaltar acerca de los sujetos de estudio es que uno de ellos ha estado en contacto con *Mtb*, mediante el manejo de la micobacteria en un laboratorio de bioseguridad nivel 3. Esto es importante porque precisamente este sujeto de estudio fue el único cuyos monocitos mostraron activación a cada uno de los péptidos de PE_PGRS33, así como a la combinación de estos.

Lo anterior denota que la previa exposición a *Mtb* podría estar ejerciendo influencia sobre la respuesta de los monocitos hacia los péptidos. El concepto de inmunidad innata entrenada podría explicar este fenómeno (Figura 17). La inmunidad innata entrenada se define como una respuesta amplificadora de las células del sistema inmune innato después de un segundo encuentro con el antígeno, ya sea hacia el antígeno que dio origen a la respuesta primaria u otro diferente (Netea et al., 2020; Tercan et al., 2021). El origen de esta inmunidad entrenada se basa en la inducción de cambios a nivel epigenético derivados de la acción de estímulos inflamatorios. Estas modificaciones epigenéticas ocurren a nivel de médula ósea y permiten que, ante un segundo estímulo, las células inmunes innatas tengan la capacidad de poder traducir con mayor facilidad y rapidez genes asociados a una respuesta inflamatoria (Arneth, 2021; Netea et al., 2020; Tercan et al., 2021). Hasta el momento se conoce que este fenómeno se observa con mayor frecuencia en monocitos/macrófagos y su presencia puede perdurar por meses o inclusive años (Netea et al., 2020).

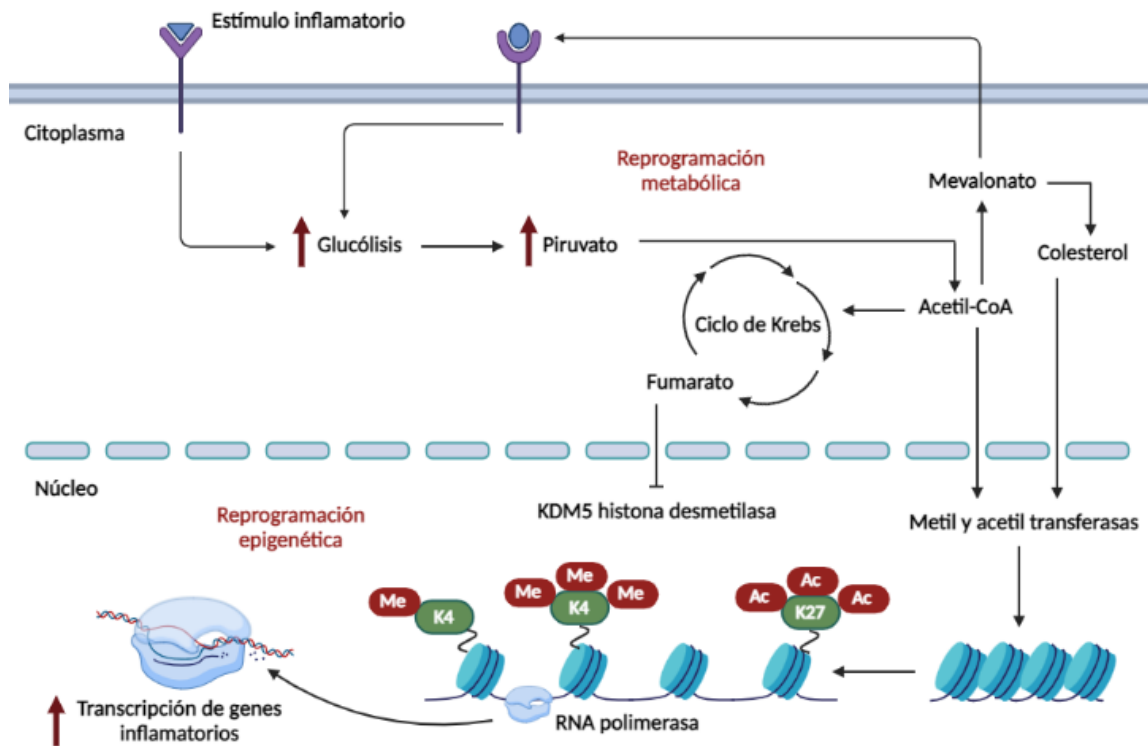


Figura 17. Inmunidad innata entrenada. Al ser expuestas a un estímulo inflamatorio (estéril/no estéril), las células del sistema inmune innato presentan una reprogramación metabólica relacionada principalmente con la glucólisis, ciclo de Krebs y el metabolismo de ácidos grasos. Esta reprogramación metabólica induce alteraciones en la producción de enzimas encargadas de la metilación y acetilación de histonas, lo que a su vez induce una reprogramación epigenética. Ante la presencia de un segundo estímulo inflamatorio, esta reprogramación epigenética facilita la transcripción de genes de la respuesta inmune inflamatoria, contribuyendo a una respuesta más rápida y potente por parte de las células inmunes innatas. Hasta el momento, el fenómeno se ha descrito principalmente en células NK y monocitos/macrófagos, presentando una duración desde meses hasta años. (Netea et al., 2020; Tercan et al., 2021). Imagen creada con Biorender.com

Existe la posibilidad de que el fenómeno de inmunidad innata entrenada este presente en el sujeto de estudio que respondió a los péptidos de PE_PGRS33 y, que la previa sensibilización hacia antígenos de *Mtb*, sea responsable de la activación observada en los monocitos del sujeto. Resultados de nuestro grupo de investigación muestran que, sujetos previamente sensibilizados a *Mtb*, desarrollan una mayor respuesta hacia PE_PGRS33 y sus péptidos (Ortega-Tirado, Niño-Padilla, et al., 2020).

La respuesta presentada por el sujeto sensibilizado puede indicar que, durante el proceso natural de infección por *Mtb*, la proteína PE_PGRS33 induce el desarrollo de una respuesta inmune, principalmente dirigida hacia los tres péptidos evaluados (PE100, PE131, PE432) en esta investigación.

CONCLUSIONES

El estudio de la respuesta inmune (RI) hacia antígenos micobacterianos continúa siendo una gran estrategia en la lucha contra *Mtb*. En el presente trabajo se emplearon un conjunto de herramientas inmunoinformáticas que permitieron el estudio de la RI hacia la proteína PE_PGRS33 de *Mtb*. Se lograron identificar cinco péptidos inmunodominantes de esta proteína, los cuales indujeron la activación de monocitos humanos en un individuo previamente sensibilizado hacia antígenos de *Mtb*, recalcando la necesidad de analizar la RI hacia un mayor número de individuos con estas características. Por su parte, PE_PGRS33 promovió la activación de los monocitos de todos los sujetos de estudio. Estos resultados hablan del potencial de PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes de activar el sistema inmune, siendo necesario evaluar el potencial protector de esta RI contra *Mtb*. En este sentido, se implementó un sistema humano de infección *in vitro* que permitirá estudiar con más detalle la RI hacia PE_PGRS33 y sus péptidos inmunodominantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar, I., Pimpin, L., Ariti, C., Beynon, R., Mangtani, P., Sterne, J., Fine, P., Smith, P., Lipman, M., Elliman, D., Watson, J., Drumright, L., Whiting, P., & Vynnycky, E. (2013). Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. In *Health Technology Assessment* (Vol. 17, Issue 37).
- Achkar, J. M., Chan, J., & Casadevall, A. (2015). B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunological Reviews*, 264(1), 167–181.
- Ali, A., Khan, A., Kaushik, A. C., Wang, Y., Ali, S. S., Junaid, M., Saleem, S., Cho, W. C. S., Mao, X., & Wei, D. Q. (2019). Immunoinformatic and systems biology approaches to predict and validate peptide vaccines against Epstein–Barr virus (EBV). *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
- Andersen, P., & Doherty, T. M. (2005). The success and failure of BCG - Implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 656–662.
- Andersen, P., & Scriba, T. J. (2019). Moving tuberculosis vaccines from theory to practice. *Nature Reviews Immunology*, 19(9), 550–562.
- Ankrah, A. O., Glaudemans, A. W. J. M., Maes, A., Van de Wiele, C., Dierckx, R. A. J. O., Vorster, M., & Sathekge, M. M. (2018). Tuberculosis. *Seminars in Nuclear Medicine*, 48(2), 108–130.
- Arneth, B. (2021). Trained innate immunity. *Immunologic Research*, 69(1), 1–7.
- Backert, L., & Kohlbacher, O. (2015). Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. *Genome Medicine*, 7(119), 1–12.
- Balboa, L., Romero, M. M., Yokobori, N., Schierloh, P., Geffner, L., Basile, J. I., Musella, R. M., Abbate, E., De La Barrera, S., Sasiain, M. C., & Alemán, M. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile. *Immunology and Cell Biology*, 88(7), 716–726.
- Basu, S., Pathak, S. K., Banerjee, A., Pathak, S., Bhattacharyya, A., Yang, Z., Talarico,

- S., Kundu, M., & Basu, J. (2007). Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1039–1050.
- Behar, B. S. M., Dascher, C. C., Grusby, M. J., Wang, C., & Brenner, M. B. (1999). Susceptibility of Mice Deficient in CD1D or TAP1 to Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(12), 1973–1980.
- Bertholet, S., Ireton, G. C., Kahn, M., Guderian, J., Mohamath, R., Stride, N., Laughlin, E. M., Baldwin, S. L., Vedvick, T. S., Coler, R. N., & Reed, S. G. (2008). Identification of Human T Cell Antigens for the Development of Vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, 181(11), 7948–7957.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., & Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, 4(1), 1–13.
- Bos, K., Harkins, K. M., Cruz, S., & Herbig, A. (2014). Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*, 514(7523), 494–497.
- Boyette, L. B., MacEdo, C., Hadi, K., Elinoff, B. D., Walters, J. T., Ramaswami, B., Chalasani, G., Taboas, J. M., Lakkis, F. G., & Metes, D. M. (2017). Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE*, 12(4), 1–20.
- Brandt, L., Cunha, J. F., Olsen, A. W., Chilima, B., Hirsch, P., Appelberg, R., & Andersen, P. (2002). Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: Some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infection and Immunity*, 70(2), 672–678.
- Brazier, B., & McShane, H. (2020). Towards new TB vaccines. *Seminars in Immunopathology*.
- Brennan, M. J. (2006). Variable Expression Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS Genes: Evidence that PE_PGRS16 and PE_PGRS26 Are Inversely

- Regulated *In Vivo*. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3721–3725.
- Cadieux, N., Parra, M., Cohen, H., Maric, D., Morris, S. L., & Brennan, M. J. (2011). Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 protein. *Microbiology*, 157(2011), 793–804.
- Cascioferro, A., Delogu, G., Colone, M., Sali, M., Stringaro, A., Arancia, G., Fadda, G., Palù, G., & Manganeli, R. (2007). PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell wall. *Molecular Microbiology*, 66(6), 1536–1547.
- Chaitra, M. G., Hariharaputran, S., Chandra, N. R., Shaila, M. S., & Nayak, R. (2005a). Defining putative T cell epitopes from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with vaccine potential. *Vaccine*, 23(10), 1265–1272.
- Chaitra, M. G., Hariharaputran, S., Chandra, N. R., Shaila, M. S., & Nayak, R. (2005b). Defining putative T cell epitopes from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with vaccine potential. *Vaccine*, 23(10), 1265–1272.
- Chaitra, M. G., Shaila, M. S., Chandra, N. R., & Nayak, R. (2008). HLA-A*0201-restricted cytotoxic T-cell epitopes in three PE/PPE family proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(4), 411–417.
- Chen, C. Y., Huang, D., Wang, R. C., Shen, L., Zeng, G., Yao, S., Shen, Y., Halliday, L., Fortman, J., McAllister, M., Estep, J., Hunt, R., Vasconcelos, D., Du, G., Porcelli, S. A., Larsen, M. H., Jacobs, W. R., Haynes, B. F., Letvin, N. L., & Chen, Z. W. (2009). A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 5(4), e1000392.
- Cliff, J. M., Lee, J. S., Constantinou, N., Cho, J. E., Clark, T. G., Ronacher, K., King, E. C., Lukey, P. T., Duncan, K., Van Helden, P. D., Walzl, G., & Dockrell, H. M. (2013). Distinct phases of blood gene expression pattern through tuberculosis treatment reflect modulation of the humoral immune response. *Journal of Infectious Diseases*, 207(1), 18–29.
- Cohen, I., Parada, C., Acosta-Gío, E., & Espitia, C. (2014). The PGRS domain from

- PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is target of humoral immune response in mice and humans. *Frontiers in Immunology*, 5(236), 1–9.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537–544.
- Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K. E., Kato-maeda, M., Parkhill, J., Malla, B., Berg, S., Thwaites, G., Yeboah-manu, D., Bothamley, G., Mei, J., Wei, L., Bentley, S., Harris, S. R., Niemann, S., Diel, R., & Aseffa, A. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics*, 45(10), 1176–1182.
- Cooper, A. M. (2009). Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 27, 393–422.
- Copin, R., Coscollá, M., & Seiffert, S. N. (2014). Sequence Diversity in the PE-PGRS genes of *M. tuberculosis* is independent of human T-cell recognition. *MBio*, 5(1), 1–11.
- Covián, C., Fernández-Fierro, A., Retamal-Díaz, A., Díaz, F. E., Vasquez, A. E., Lay, M. K., Riedel, C. A., González, P. A., Bueno, S. M., & Kalergis, A. M. (2019). BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*, 10, 1–14.
- de Martino, M., Lodi, L., Galli, L., & Chiappini, E. (2019). Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. *Frontiers in Pediatrics*, 7, 1–8.
- Delogu, G., & Brennan, M. J. (2001). Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 69(9), 5606–5611.
- Delogu, G., Camassa, S., Palucci, I., Iantomasi, R., Cubeddu, T., Minerva, M., De Maio, F., Jouny, S., Petruccioli, E., Goletti, D., Ria, F., Sali, M., Sanguinetti, M., Manganeli, R., Rocca, S., & Brodin, P. (2017). Impact of pe_pgrs33 Gene Polymorphisms on *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Pathogenesis.

- Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(137), 1–16.
- Dhanda, S. K., Usmani, S. S., Agrawal, P., Nagpal, G., Gautam, A., & Raghava, G. P. S. (2017). Novel *in silico* tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. *Briefings in Bioinformatics*, 18(3), 467–478.
- Dheenadhayalan, V., Delogu, G., & Brennan, M. J. (2006). Expression of the PE_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes and Infection*, 8(1), 262–272.
- Dikhit, M. R., Kumar, A., Das, S., Dehury, B., Rout, A. K., Jamal, F., Sahoo, G. C., Topno, R. K., Pandey, K., Das, V. N. R., Bimal, S., & Das, P. (2017). Identification of potential MHC Class-II-restricted epitopes derived from *Leishmania donovani* antigens by reverse vaccinology and evaluation of their CD4+ T-cell responsiveness against visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 8(1763), 1–17.
- Dispenza, M. C. (2019). Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy and Asthma Proceedings*, 40(6), 470–473.
- Dockrell, H. M., & Smith, S. G. (2017). What have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years? *Frontiers in Immunology*, 8(1134), 1–10.
- Dorman, S. E., & Holland, S. M. (1998). Mutation in the signal-transducing chain of the interferon- γ receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *Journal of Clinical Investigation*, 101(11), 2364–2369.
- Ehlers, S., & Schaible, U. E. (2012). The granuloma in tuberculosis: Dynamics of a host-pathogen collusion. *Frontiers in Immunology*, 3(411), 1–9.
- Fatima, S., Kumari, A., Das, G., & Dwivedi, V. P. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sciences*, 252.
- Firbas, C., Jilma, B., Tauber, E., Buerger, V., Jelovcan, S., Lingnau, K., Buschle, M., Frisch, J., & Klade, C. S. (2006). Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: A randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects. *Vaccine*, 24(20), 4343–4353.
- Fremont, D. H., Monnaie, D., Nelson, C. A., Hendrickson, W. A., & Unanue, E. R. (1998). Crystal structure of I-A(k) in complex with a dominant epitope of lysozyme.

- Immunity*, 8(3), 305–317.
- Furin, J., Cox, H., & Pai, M. (2019). Tuberculosis. *The Lancet*, 393(10181), 1642–1656.
- Gagliardi, M. C. (2005). *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(1), 106–113.
- García, M. D. L. Á., Sarmiento, M. E., Acosta, A., Finlay, I., Vacunas, C. D. I. De, No, A., Lisa, L., & Habana, C. D. La. (2009). La inmunidad antituberculosa y su aplicación en el desarrollo de candidatos vacunales. *Vaccinmonitor*, 1(19805), 25–34.
- Garra, A. O., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., & Berry, M. P. R. (2013). The Immune Response in Tuberculosis. *The Annual Review of Immunology*, 31, 475–527.
- Garza-Cuartero, L., McCarthy, E., Brady, J., Cassidy, J., Hamilton, C., Sekiya, M., McNair, J., & Mulcahy, G. (2015). Development of an *in vitro* model of the early-stage bovine tuberculous granuloma using *Mycobacterium bovis*-BCG. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 168(3–4), 249–257.
- Gastelum-Aviña, P., Velazquez, C., Espitia, C., Lares-Villa, F., & Garibay-Escobar, A. (2015). A PE_PGRS33 protein of *Mycobacterium tuberculosis*: an ideal target for future tuberculosis vaccine design. *Expert Review of Vaccines*, 14(5), 699–711.
- Greenbaum, J., Sidney, J., Chung, J., Brander, C., Peters, B., & Sette, A. (2011). Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics*, 63(6), 325–335.
- Halling-brown, M., Sansom, C. E., Davies, M., Titball, R. W., & Moss, D. S. (2008). Are bacterial vaccine antigens T-cell epitope depleted? *Trends in Immunology*, 29(8), 374–379.
- Hanekom, W. A. (2005). The immune response to BCG vaccination of newborns. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1062, 69–78.
- Hernandez, J., Velazquez, C., Valenzuela, O., Robles-Zepeda, R., Ruiz-Bustos, E., Navarro, M., & Garibay-Escobar, A. (2010). Low number of peripheral blood B

- lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunological Investigations*, 39(3), 197–205.
- Jaravine, V., Mösch, A., Raffegerst, S., Schendel, D. J., & Frishman, D. (2017). Expitope 2.0: A tool to assess immunotherapeutic antigens for their potential cross-reactivity against naturally expressed proteins in human tissues. *BMC Cancer*, 17(1), 1–9.
- Jiao, X., Lo-Man, R., Guermonprez, P., Fiette, L., Dériaud, E., Burgaud, S., Gicquel, B., Winter, N., & Leclerc, C. (2002). Dendritic Cells Are Host Cells for Mycobacteria *In Vivo* That Trigger Innate and Acquired Immunity. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1294–1301.
- Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Lammas, D., Dorman, S. E., Fondanèche, M. C., Dupuis, S., Döffinger, R., Altare, F., Girdlestone, J., Emile, J. F., Ducoulombier, H., Edgar, D., Clarke, J., Oxelius, V. A., Brai, M., Novelli, V., Heyne, K., Fischer, A., Holland, S. M., ... Casanova, J. L. (1999). A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nature Genetics*, 21(4), 370–378.
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 64–79.
- Kaufmann, S. H. E. (2013). Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation. *Seminars in Immunology*, 25(2), 172–181.
- Kaufmann, S. H. E., Weiner, J., & von Reyn, C. F. (2017). Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *International Journal of Infectious Diseases*, 56(2017), 263–267.
- Klein, M. R., Smith, S. M., Hammond, A. S., Ogg, G. S., King, A. S., Vekemans, J., Jaye, A., Lukey, P. T., & McAdam, K. P. W. J. (2001). HLA-B*35-Restricted CD8 T cell epitopes in the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases*, 183(6), 928–934.
- Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Novak, P., & Novak, M. (2014). First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an

- Alzheimer's disease model. *Alzheimer's Research and Therapy*, 6(4), 1–12.
- Koski, G. K., Koldovsky, U., Xu, S., Mick, R., Sharma, A., Fitzpatrick, E., Weinstein, S., Nisenbaum, H., Levine, B. L., Fox, K., Zhang, P., & Czerniecki, B. J. (2012). A novel dendritic cell-based immunization approach for the induction of durable Th1-polarized Anti-HER-2/neu responses in women with early breast cancer. *Journal of Immunotherapy*, 35(1), 54–65.
- Kozakiewicz, L., Chen, Y., Xu, J., Wang, Y., Dunussi-Joannopoulos, K., Ou, Q., Flynn, J. L., Porcelli, S. A., Jacobs, W. R., & Chan, J. (2013). B Cells Regulate Neutrophilia during *Mycobacterium tuberculosis* Infection and BCG Vaccination by Modulating the Interleukin-17 Response. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003472.
- Kroon, E. E., Coussens, A. K., Kinnear, C., Orlova, M., Möller, M., Seeger, A., Wilkinson, R. J., Hoal, E. G., & Schurr, E. (2018). Neutrophils: Innate effectors of TB resistance? *Frontiers in Immunology*, 9(2637), 1–12.
- Kunnath-Velayudhan, S., Salamon, H., Wang, H. Y., Davidow, A. L., Molina, D. M., Huynh, V. T., Cirillo, D. M., Michel, G., Talbot, E. A., Perkins, M. D., Felgner, P. L., Liang, X., & Gennaro, M. L. (2010). Dynamic antibody responses to the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14703–14708.
- Lacosta, A. M., Pascual-Lucas, M., Pesini, P., Casabona, D., Pérez-Grijalba, V., Marcos-Campos, I., Sarasa, L., Canudas, J., Badi, H., Monleón, I., San-José, I., Munuera, J., Rodríguez-Gómez, O., Abdelnour, C., Lafuente, A., Buendía, M., Boada, M., Tárraga, L., Ruiz, A., & Sarasa, M. (2018). Safety, tolerability and immunogenicity of an active anti-A β 40 vaccine (ABvac40) in patients with Alzheimer's disease: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase i trial. *Alzheimer's Research and Therapy*, 10(1), 1–13.
- Lerner, T. R., Borel, S., & Gutierrez, M. G. (2015). The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular Microbiology*, 17(9), 1277–1285.
- Li, J., Zhao, A., Tang, J., Wang, G., Shi, Y., Zhan, L., & Qin, C. (2020). Tuberculosis vaccine development: from classic to clinical candidates. *European Journal of*

Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

- Lin, H. H., Zhang, G. L., Tongchusak, S., Reinherz, E. L., & Brusica, V. (2008). Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics*, 1–10.
- Maglione, P. J., Xu, J., Casadevall, A., & Chan, J. (2008). Fcγ Receptors Regulate Immune Activation and Susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology*, 180(5), 3329–3338.
- Malonis, R. J., Lai, J. R., & Vergnolle, O. (2020). Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. *Chemical Reviews*, 120(6), 3210–3229.
- Meena, L. S. (2015). An overview to understand the role of PE-PGRS family proteins in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and their potential as new drug targets. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(2), 145–153.
- Mihret, A. (2012). The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Virulence*, 3(7), 654–659.
- Minerva, M., De Maio, F., Camassa, S., Battah, B., Ivana, P., Manganelli, R., Sanguinetti, M., Sali, M., & Delogu, G. (2017). Evaluation of PE PGRS33 as a potential surface target for humoral responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathogens and Disease*, 75(8), 1–8.
- Moliva, J. I., Turner, J., & Torrelles, J. B. (2017). Immune responses to bacillus Calmette-Guérin vaccination: Why do they fail to protect against *Mycobacterium tuberculosis*? *Frontiers in Immunology*, 8(407).
- Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2018). Homology Modeling in Drug Discovery: Overview, Current Applications and Future Perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(1), 12–20.
- Narayana, Y., Joshi, B., Katoch, V. M., Mishra, K. C., & Balaji, K. N. (2007). Differential B-cell responses are induced by *Mycobacterium tuberculosis* PE antigens Rv1169c, Rv0978c, and Rv1818c. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(10), 1334–1341.
- Nelson, C. A., Viner, N. J., Young, S. P., Petzold, S. J., & Unanue, E. R. (1996). A negatively charged anchor residue promotes high affinity binding to the MHC class

- II molecule I-Ak. *Journal of Immunology*, 157, 755–762.
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, W. J. M., Riksen, N. P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Stabell Benn, C., Sun, J. C., Xavier, R. J., & Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 375–388.
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., & Niederweis, M. (2015). Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunological Reviews*, 264(1), 249–263.
- Nezafat, N., Karimi, Z., Eslami, M., Mohkam, M., Zandian, S., & Ghasemi, Y. (2016). Designing an efficient multi-epitope peptide vaccine against *Vibrio cholerae* via combined immunoinformatics and protein interaction based approaches. *Computational Biology and Chemistry*, 62, 82–95.
- Novak, P., Schmidt, R., Kontsekkova, E., Kovacech, B., Smolek, T., Katina, S., Fialova, L., Prcina, M., Parrak, V., Dal-Bianco, P., Brunner, M., Staffen, W., Rainer, M., Ondrus, M., Ropele, S., Smisek, M., Sivak, R., Zilka, N., Winblad, B., & Novak, M. (2018). FUNDAMANT: An interventional 72-week phase 1 follow-up study of AADvac1, an active immunotherapy against tau protein pathology in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 10(1), 1–16.
- Ortega-Tirado, D. (2016). Evaluación del efecto protector in vitro de la proteína PE_PGRS33 de *Mycobacterium tuberculosis* [Universidad de Sonora].
- Ortega-Tirado, D., Arvizu-Flores, A. A., Velazquez, C., & Garibay-Escobar, A. (2020). The role of immunoinformatics in the development of T-cell peptide-based vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Review of Vaccines*, 19(9), 831–841.
- Ortega-Tirado, D., Niño-Padilla, E. I., Arvizu-Flores, A. A., Velazquez, C., Espitia, C., Serrano, C. J., Enciso-Moreno, J. A., Sumoza-Toledo, A., & Garibay-Escobar, A. (2020). Identification of immunogenic T-cell peptides of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 protein. *Molecular Immunology*, 125, 123–130.
- Ottenhoff, T. H. M., Elferink, D. G., Hermans, J., & de Vries, R. R. P. (1985). HLA class II restriction repertoire of antigen-specific T cells. I. The main restriction

- determinants for antigen presentation are associated with HLA-D/DR and not with DP and DQ. *Human Immunology*, *13*(2), 105–116.
- Ottenhoff, T. H. M., Kumararatne, D., & Casanova, J. (1998). of Type-1 Cytokines in Immunity To Intracellular Bacteria. *Immunology*, *19*(11), 491–494.
- Pacheco-Sánchez, M. A., Contreras-Vergara, C. A., Hernandez-Navarro, E., Yepiz-Plascencia, G., Martínez-Téllez, M. A., Casas-Flores, S., Arvizu-Flores, A. A., & Islas-Osuna, M. A. (2014). Molecular modeling and expression analysis of a MADS-box cDNA from mango (*Mangifera indica L.*). *3 Biotech*, *4*(4), 357–365.
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*.
- Palucci, I., Camassa, S., Cascioferro, A., Sali, M., Anosheh, S., Zumbo, A., Minerva, M., Iantomasi, R., De Maio, F., Di Sante, G., Ria, F., Sanguinetti, M., Palù, G., Brennan, M. J., Manganelli, R., & Delogu, G. (2016). PE-PGRS33 contributes to *Mycobacterium tuberculosis* entry in macrophages through interaction with TLR2. *PLoS ONE*, *11*(3), 1–15.
- Pandey, R. K., Bhatt, T. K., & Prajapati, V. K. (2018). Novel Immunoinformatics Approaches to Design Multi-epitope Subunit Vaccine for Malaria by Investigating Anopheles Salivary Protein. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–11.
- Patronov, A., & Doytchinova, I. (2013). T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biology*, *3*, 120–139.
- Principi, N., & Esposito, S. (2015). The present and future of tuberculosis vaccinations. *Tuberculosis*, *95*(1), 6–13.
- Rajkumar Soni, A. M. K., & Archana Tiwari, A. G. (2013). Reverse Vaccinology: Basics and Applications. *Journal of Vaccines & Vaccination*, *4*(6), 1–5.
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, *12*(5), 352–366.
- Rammensee, H. G., Bachmann, J., Emmerich, N. N., Bachor, O. A., & Stefanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs .

- Immunogenetics*, 50(1999), 213–219.
- Rana, A., & Akhter, Y. (2016). A multi-subunit based, thermodynamically stable model vaccine using combined immunoinformatics and protein structure based approach. *Immunobiology*, 221(4), 544–557.
- Robinson, R. T., Orme, I. M., & Cooper, A. M. (2015). The onset of adaptive immunity in the mouse model of tuberculosis and the factors that compromise its expression. *Immunological Reviews*, 264(1), 46–59.
- Rojas, M., Restrepo-Jiménez, P., Monsalve, D. M., Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Ramírez-Santana, C., Leung, P. S. C., Ansari, A. A., Gershwin, M. E., & Anaya, J. M. (2018). Molecular mimicry and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 95, 100–123.
- Russell, D. G., Cardona, P. J., Kim, M. J., Allain, S., & Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology*, 10(9), 943–948.
- Saadi, M., Karkhah, A., & Nouri, H. R. (2017). Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. *Infection, Genetics and Evolution*, 51, 227–234.
- Scriba, T. J., Kalsdorf, B., Abrahams, D.-A., Isaacs, F., Hofmeister, J., Black, G., Hassan, H. Y., Wilkinson, R. J., Walzl, G., Gelderbloem, S. J., Mahomed, H., Hussey, G. D., & Hanekom, W. A. (2008). Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4 + T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response . *The Journal of Immunology*, 180(3), 1962–1970.
- Shah, P., Mistry, J., Reche, P. A., Gatherer, D., & Flower, D. R. (2018). *In silico* design of *Mycobacterium tuberculosis* epitope ensemble vaccines. *Molecular Immunology*, 97, 56–62.
- Shams, H., Klucar, P., Weis, S. E., Lalvani, A., Moonan, P. K., Safi, H., Wizel, B., Ewer, K., Nepom, G. T., Lewinsohn, D. M., Andersen, P., & Barnes, P. F. (2004). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Peptide That Is Recognized by

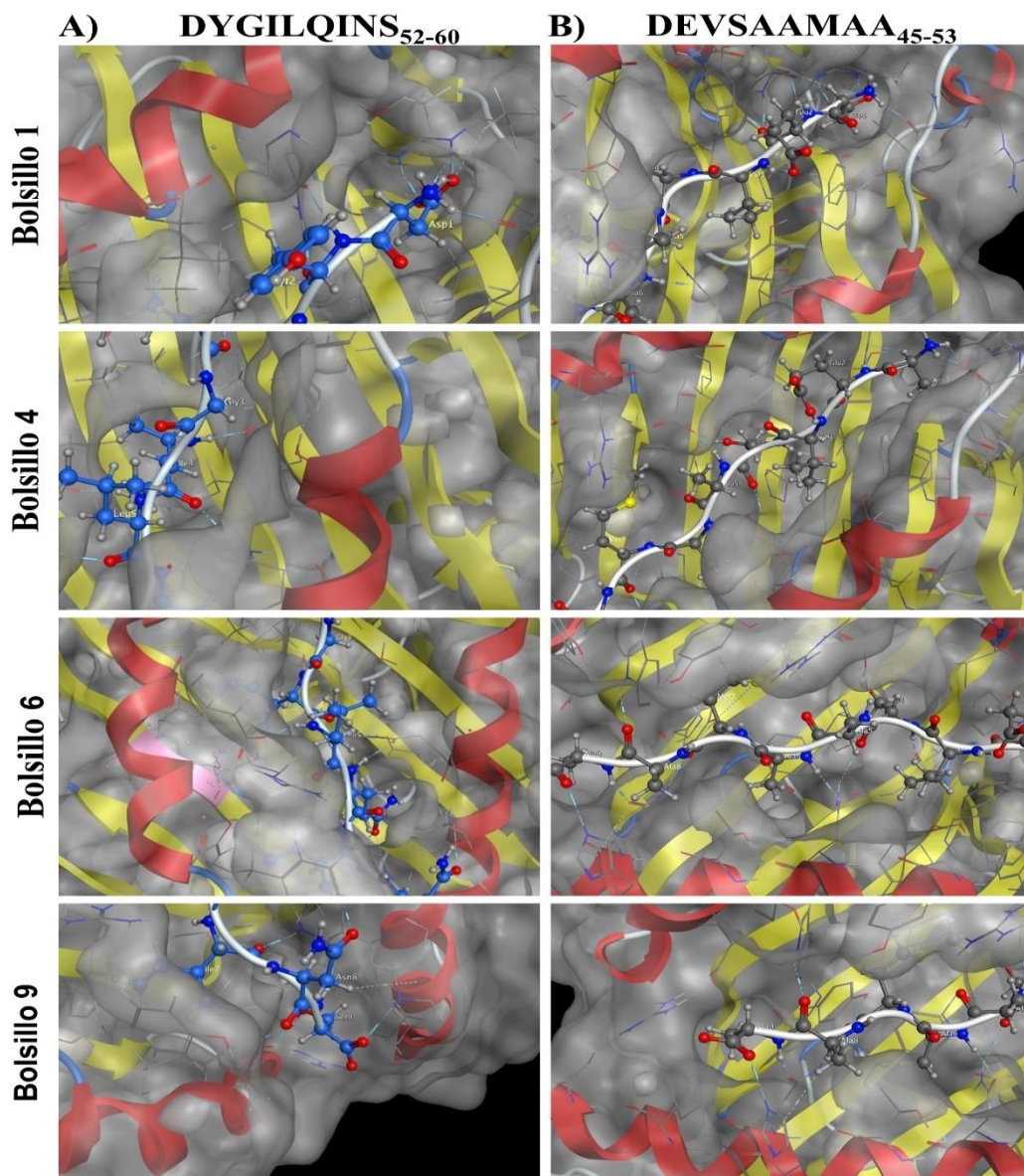
- Human CD4 + and CD8 + T Cells in the Context of Multiple HLA Alleles . *The Journal of Immunology*, 173(3), 1966–1977.
- Sia, J. K., Bizzell, E., Madan-Lala, R., & Rengarajan, J. (2017). Engaging the CD40-CD40L pathway augments T-helper cell responses and improves control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS Pathogens*, 13(8), 1–22.
- Sia, J. K., & Rengarajan, J. (2019). Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiology Spectrum*, 7(4), 3–22.
- Singh, P. P., Parra, M., Cadieux, N., & Brennan, M. J. (2008). A comparative study of host response to three *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS proteins. *Microbiology*, 154(11), 3469–3479.
- Soares, A. P., Kwong Chung, C. K. C., Choice, T., Hughes, E. J., Jacobs, G., Van Rensburg, E. J., Khomba, G., De Kock, M., Lerumo, L., Makhetha, L., Maneli, M. H., Pienaar, B., Smit, E., Tena-Coki, N. G., Van Wyk, L., Boom, W. H., Kaplan, G., Scriba, T. J., & Hanekom, W. A. (2013). Longitudinal changes in CD4+ T-cell memory responses induced by BCG vaccination of newborns. *Journal of Infectious Diseases*, 207(7), 1084–1094.
- Soundarya, J. S. V., Ranganathan, U. D., & Tripathy, S. P. (2019). Current trends in tuberculosis vaccine. *Medical Journal Armed Forces India*, 75(1), 18–24.
- Suárez, I., Fünfer, S. M., Rademacher, J., Fätkenheuer, G., Kröger, S., & Rybniker, J. (2019). The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Deutsches Arzteblatt International*, 116(43), 729–735.
- Tan, B. H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Bloom, B. R., Ganz, T., Modlin, R. L., & Stenger, S. (2006). Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1864–1871.
- Tercan, H., Riksen, N. P., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., & Bekkering, S. (2021). Trained Immunity; Long-term adaptation in innate immune responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(1), 55–61.
- Tezera, L. B., Bielecka, M. K., Chancellor, A., Reichmann, M. T., Shammari, B. Al,

- Brace, P., Batty, A., Tocheva, A., Jogai, S., Marshall, B. G., Tebruegge, M., Jayasinghe, S. N., Mansour, S., & Elkington, P. T. (2017). Dissection of the host-pathogen interaction in human tuberculosis using a bioengineered 3-dimensional model. *ELife*, *6*, 1–19.
- Tian, C., & Jian-ping, X. (2010). Roles of PE_PGRS family in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and novel measures against tuberculosis. *Microbial Pathogenesis*, *49*(6), 311–314.
- Tiemersma, E. W., Werf, M. J. Van Der, Borgdorff, M. W., Williams, B. G., & Nico, J. D. (2011). *Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review*. *PLoS One*, *6*(4).
- Tsai, M. C., Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C., Tufariello, J. A., Flynn, J. A., & Chan, J. (2006). Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: Cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular Microbiology*, *8*(2), 218–232.
- Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, A., Toyoshima, K., & Seya, T. (2000). Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: Involvement of toll-like receptors. *Infection and Immunity*, *68*(12), 6883–6890.
- Turner, M. J., Abdul-alim, C. S., Willis, R. A., Fisher, T. L., Lord, E. M., & Frelinger, J. G. (2001). T-cell antigen discovery T-CAD / assay: a novel technique for identifying T cell epitopes. *Journal of Immunological Methods*, *256*, 107–119.
- Vallecillo, A. J., & Espitia, C. (2009). Expression of *Mycobacterium tuberculosis* pe_pgrs33 is repressed during stationary phase and stress conditions, and its transcription is mediated by sigma factor A. *Microbial Pathogenesis*, *46*(3), 119–127.
- Van Doorn, E., Liu, H., Ben-Yedidia, T., Hassin, S., Visontai, I., Norley, S., Frijlink, H. W., & Hak, E. (2017). Evaluating the immunogenicity and safety of a BiondVax-developed universal influenza vaccine (Multimeric-001) either as a standalone

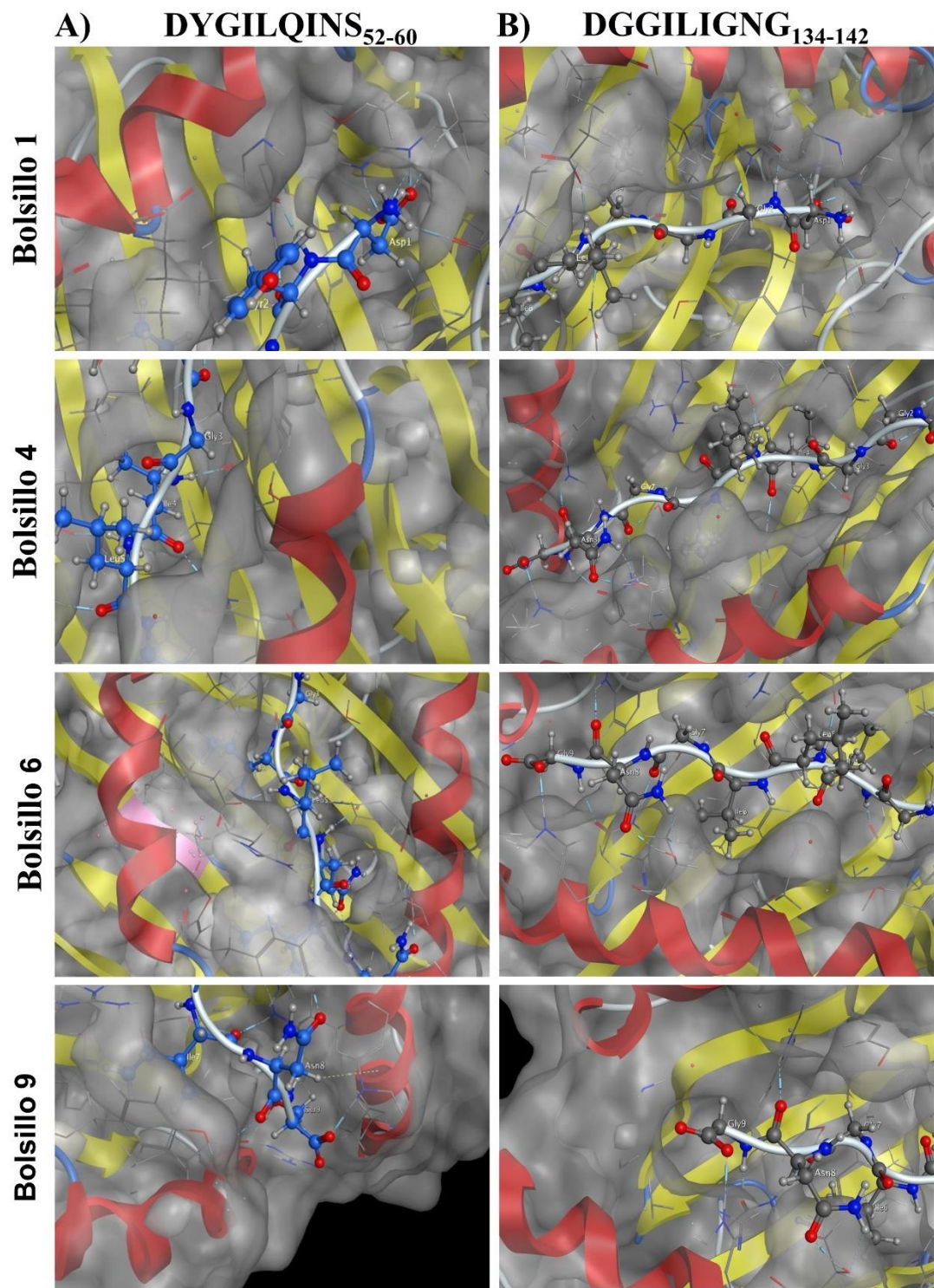
- vaccine or as a primer to H5N1 influenza vaccine. *Medicine (United States)*, 96(11).
- Van Pinxteren, L. A. H., Cassidy, J. P., Smedegaard, B. H. C., Agger, E. M., & Andersen, P. (2000). Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *European Journal of Immunology*, 30(12), 3689–3698.
- Vynnycky, E., & Fine, P. E. M. (1997). The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiology & Infection*, 119(2), 183–201.
- World Health Organization. (2021). *Global Tuberculosis Report 2021*.
- Wu, T., Guo, S., Wang, J., Li, L., Xu, L., Liu, P., Ma, S., Zhang, J., Xu, L., & Luo, Y. (2011). Interaction between mannosylated lipoarabinomannan and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin influences dendritic cells maturation and T cell immunity. *Cellular Immunology*, 272(1), 94–101.
- Yang, J., Chow, I.-T., Sosinowski, T., Torres-Chinn, N., Greenbaum, C. J., James, E. A., Kappler, J. W., Davidson, H. W., & Kwok, W. W. (2014). Autoreactive T cells specific for insulin B:11-23 recognize a low-affinity peptide register in human subjects with autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), 14840–14845.
- Zhang, Y., Zhou, Y., Lou, J., Li, J., Bo, L., Zhu, K., Wan, X., Deng, X., & Cai, Z. (2010). PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Critical Care*, 14(6), 1–9.
- Zumbo, A., Palucci, I., Cascioferro, A., Sali, M., Ventura, M., D'Alfonso, P., Iantomasi, R., Di Sante, G., Ria, F., Sanguinetti, M., Fadda, G., Manganelli, R., & Delogu, G. (2013). Functional dissection of protein domains involved in the immunomodulatory properties of PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathogens and Disease*, 69(3), 232–239.

ANEXO 1

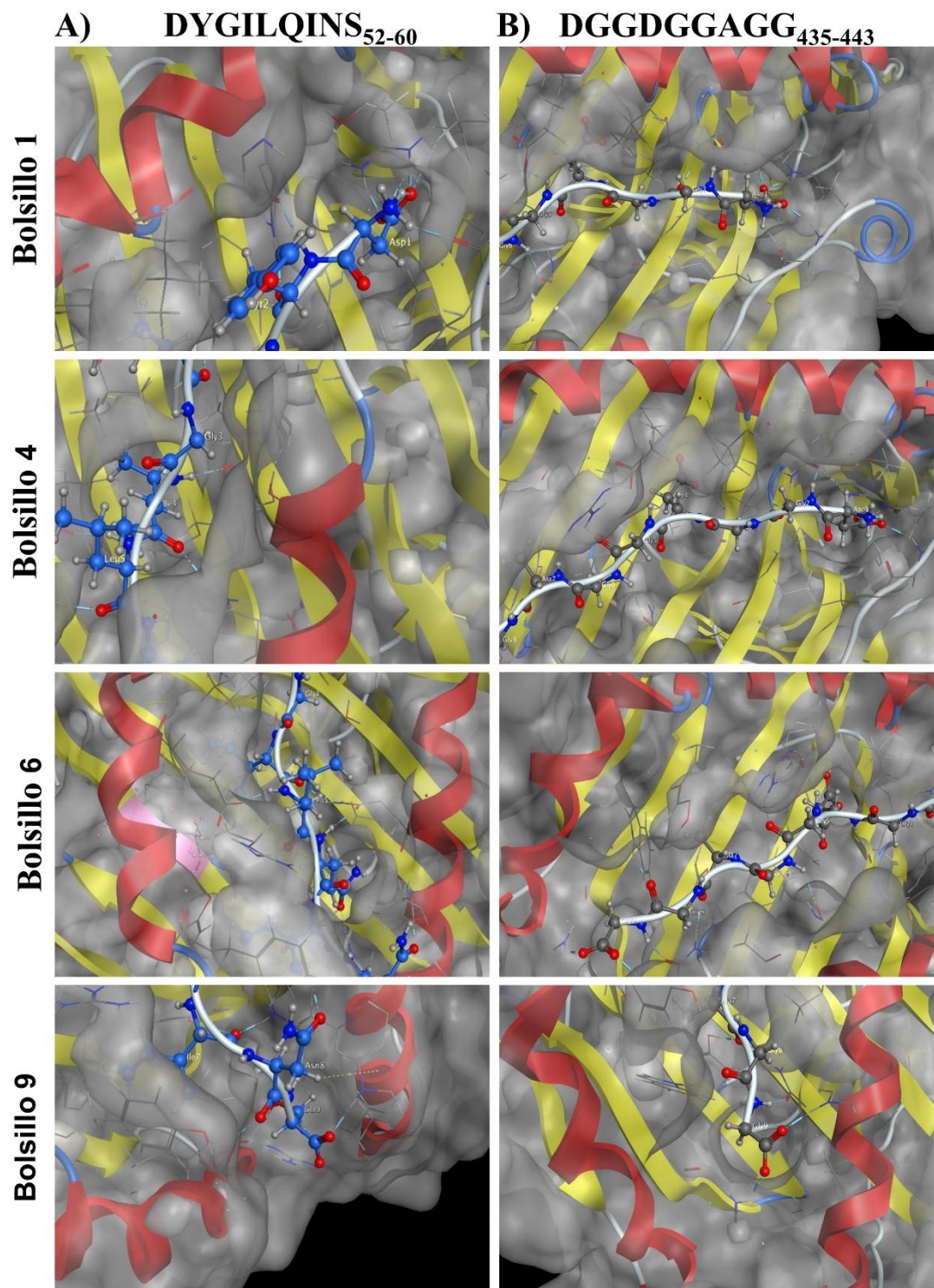
Modelados de Homología de Péptidos Inmunodominantes de la Proteína PE_PGRS33



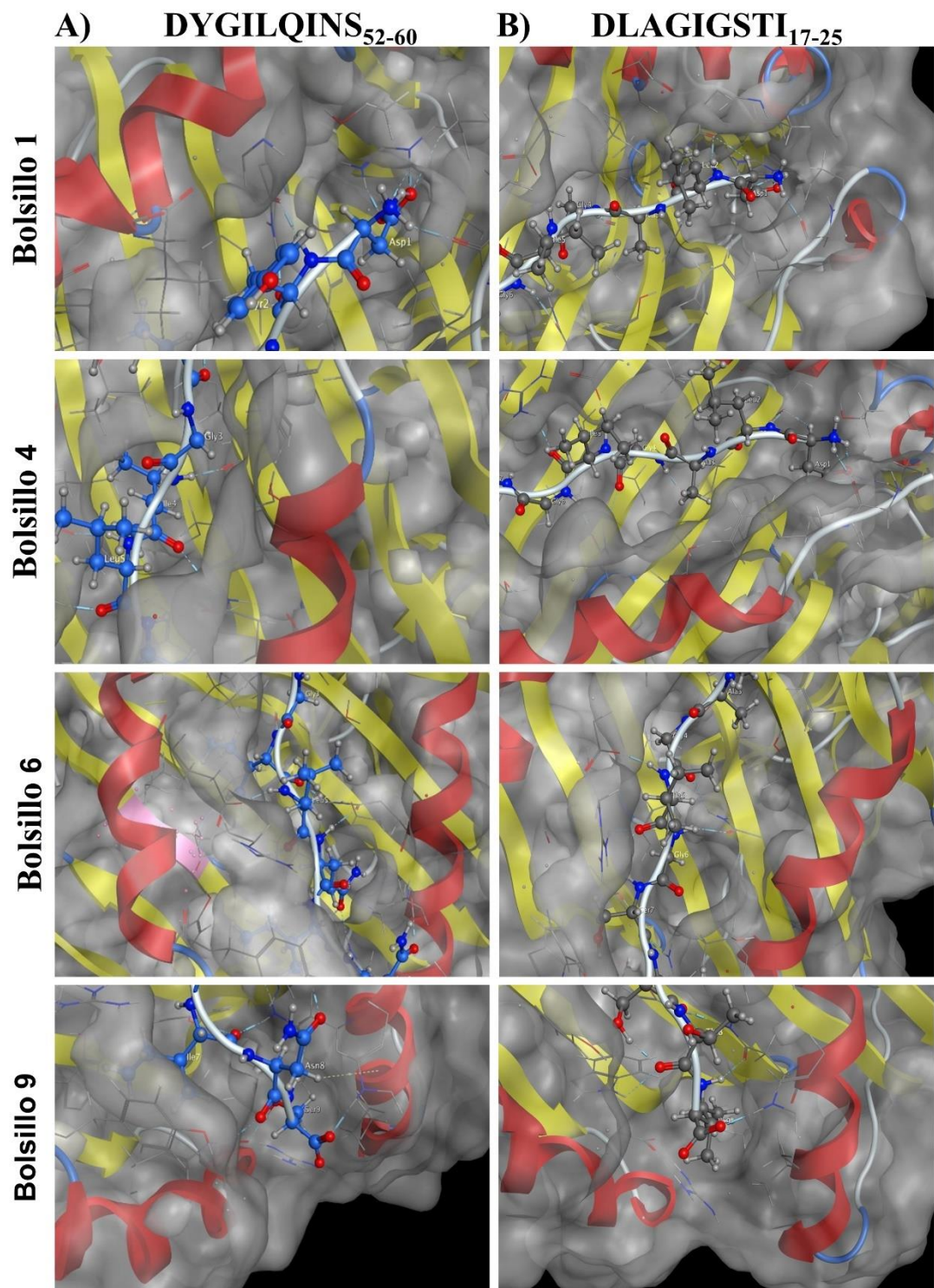
A). Péptido modelo. B) Péptido inmunodominante de la proteína PE_PGRS33



A). Péptido modelo. B) Péptido inmunodominante de la proteína PE_PGRS33



A). Péptido modelo. B) Péptido inmunodominante de la proteína PE_PGRS33



A). Péptido modelo. B) Péptido inmunodominante de la proteína PE_PGRS33

ANEXO 2

Interacciones Moleculares de Péptidos Inmunodominantes de la proteína PE_PGRS33 con la Molécula de MHC II I-A^k

Interacciones moleculares del péptido DEVSAAMAA₄₅₋₅₃ con I-A^k

Bolsillo	Aminoácidos de DYGILQINS ₅₂₋₆₀	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k	Aminoácidos de DEVSAAMAA ₄₅₋₅₃	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k
1	Asp	Arg 79, Arg 80	Asp	Arg 79, Arg 80
4	Ile	Tyr 35, Asn 89	Ser	Tyr 35, Glu 99, Asn 89
6	Gln	Asn 89, Asn 96, His 36	Ala	Asn 89
9	Ser	Asn 96, His 95, Asp 84, Arg 103	Ala	Asn 96, His 95

Interacciones moleculares del péptido DGGILIGNG₁₃₄₋₁₄₂ con I-A^k

Bolsillo	Aminoácidos de DYGILQINS ₅₂₋₆₀	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k	Aminoácidos de DGGILIGNG ₁₃₄₋₁₄₂	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k
1	Asp	Arg 79, Arg 80	Asp	Arg 79, Arg 80
4	Ile	Tyr 35, Asn 89	Ile	Tyr 35, Asn 89
6	Gln	Asn 89, Asn 96, His 36	Ile	Phe 38
9	Ser	Asn 96, His 95, Asp 84, Arg 103	Gly	Asn 96, His 95

Interacciones moleculares del péptido DGGDGGAGG₄₃₅₋₄₄₃ con I-A^k

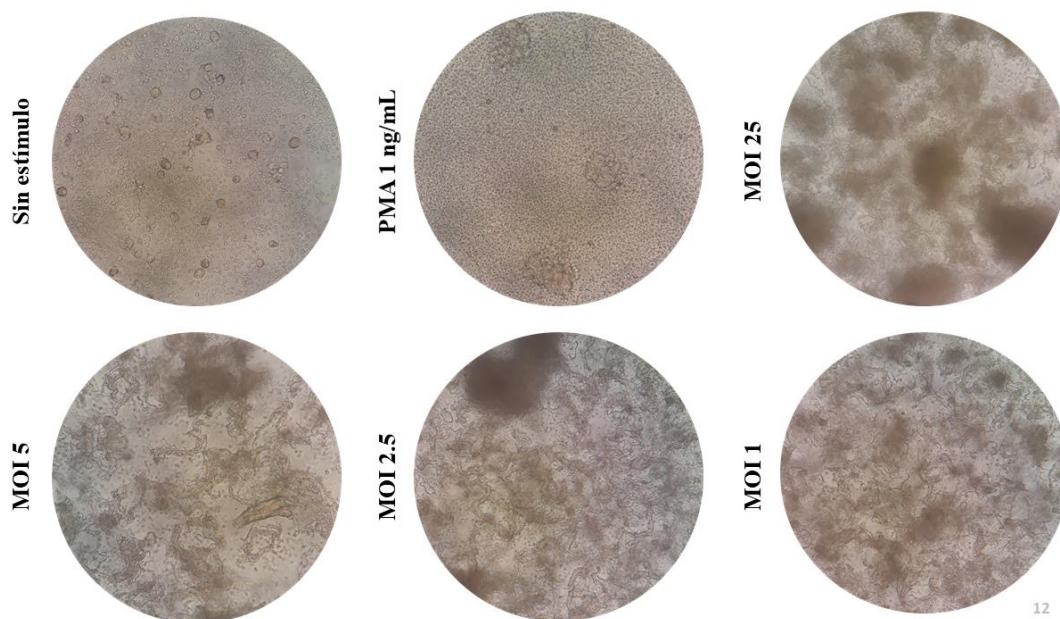
Bolsillo	Aminoácidos de DYGILQINS ₅₂₋₆₀	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k	Aminoácidos de DGGDGGAGG ₄₃₅₋₄₄₃	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k
1	Asp	Arg 79, Arg 80	Asp	Arg 79, Arg 80
4	Ile	Tyr 35, Asn 89	Asp	Tyr 35
6	Gln	Asn 89, Asn 96, His 36	Gly	Asn 89
9	Ser	Asn 96, His 95, Asp 84, Arg 103	Gly	Asn 96, His 95, Arg 103

Interacciones moleculares del péptido DLAGIGSTI₁₇₋₂₅ con I-A^k

Bolsillo	Aminoácidos de DYGILQINS ₅₂₋₆₀	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k	Aminoácidos de DLAGIGSTI ₁₇₋₂₅	Aminoácidos en bolsillo de I-A ^k
1	Asp	Arg 79, Arg 80	Asp	Arg 79, Arg 80
4	Ile	Tyr 35, Asn 89	Gly	Tyr 35, Asn 89
6	Gln	Asn 89, Asn 96, His 36	Gly	Asn 89
9	Ser	Asn 96, His 95, Asp 84, Arg 103	Ile	Asn 96, His 95

ANEXO 3

Liberación de *M. bovis* BCG al Medio Extracelular y Formación de Cordones Bacterianos



Se infectaron células mononucleares de sangre periférica humanas con *M. bovis* BCG a distintas dosis. Se realizaron observaciones por microscopia óptica cada 24 h. En el día 9 y 13 del ensayo se observan estructuras tipo cordón formadas por la liberación de la bacteria al medio extracelular. En la imagen se aprecia el cultivo celular en el día 20 donde se ve que los cordones de bacteria se han vuelto más notorios.